

**Wirkungen von Hormonen  
und Methyl 2-benzimidazolcarbammat  
auf die Chromosomen von  
menschlichen Lymphozyten in vitro**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

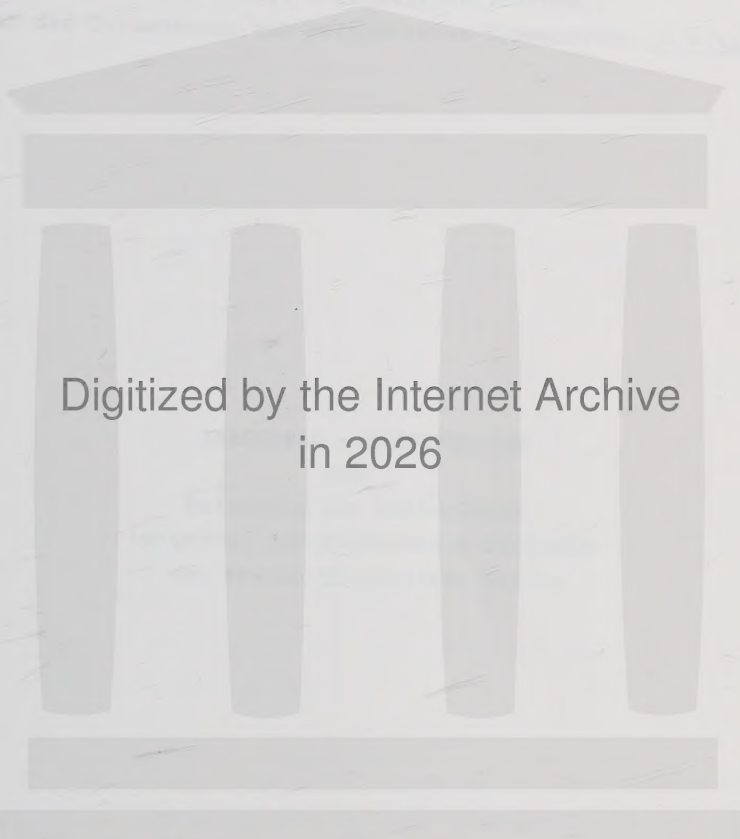
**Erlangung der Doktorwürde  
vorgelegt dem Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin**

von

**Dipl.- Biol. Norbert Banduhn  
aus Hildesheim**

1984





Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41546612\\_0001](https://archive.org/details/IA41546612_0001)

Druck: Copy-Center in Dahlem  
Ladenbergstraße 2-4

1000 Berlin 33

Tel. 821 12 27

Wirkungen von Hormonen  
und Methyl 2-benzimidazolcarbamat  
auf die Chromosomen von menschlichen Lymphozyten in vitro

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
vorgelegt dem Fachbereich Biologie  
der Freien Universität Berlin

von  
Dipl.-Biol. Norbert Banduhn  
aus Hildesheim

Erster Referent: Prof. Dr. G. Obe

Zweiter Referent: Prof. Dr. B. Beek

Tag der Promotion: 6. 7. 84

INHALT

|                                                                                     | Seite |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1. EINLEITUNG .....                                                                 | 7     |
| 1.1. Arten genotoxischer Wirkung.....                                               | 7     |
| 1.2. Chemische Mutagene .....                                                       | 7     |
| 1.3. Beziehungen zwischen genotoxischen und<br>tumorigenen Wirkungen .....          | 9     |
| 1.4. Methoden zum Nachweis genotoxischer<br>Wirkungen .....                         | 10    |
| 1.4.1. Humanlymphozyten als Testsystem zum<br>Nachweis von mutagenen Agenzien ..... | 11    |
| 1.5. Genommutationen und deren Nachweis .....                                       | 13    |
| 1b. Substanzen .....                                                                | 16    |
| 1b.1. Untersuchte Substanzen .....                                                  | 16    |
| 1b.2. Methyl 2-benzimidazolcarbamat (MBC).....                                      | 17    |
| 1b.3. Diethylstilbestrol (DES) .....                                                | 18    |
| 1b.4. Natürlich vorkommende Steroidhormone ...                                      | 19    |
| 1b.5. Hormonale Kontrazeptiva und andere<br>Sexualsteroidderivate .....             | 21    |
| 1b.6. Erläuterungen zu den Literaturtabellen .                                      | 23    |
| 1b.6.1. Literaturtabellen .....                                                     | 25    |
| MBC .....                                                                           | 25    |
| DES .....                                                                           | 30    |
| Natürlich vorkommende Sexualsterioide ...                                           | 39    |
| Sexualsteroidderivate und OC .....                                                  | 43    |
| 2. MATERIAL UND METHODEN .....                                                      | 55    |
| 2.1. Aufgabenstellung und Testsystem .....                                          | 55    |
| 2.2. Zellmaterial und Kultivierung .....                                            | 55    |

|        |                                                                                                                                                                                                                      |    |
|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.1. | Kulturansatz .....                                                                                                                                                                                                   | 56 |
| 2.3.   | Aufarbeitung .....                                                                                                                                                                                                   | 57 |
| 2.4.   | BUDr - Einbau .....                                                                                                                                                                                                  | 58 |
| 2.5.   | Zentromerisches Heterochromatin .....                                                                                                                                                                                | 59 |
| 2.6.   | Präparatfärbung .....                                                                                                                                                                                                | 59 |
| 2.6.1. | Giemsa - Normalfärbung .....                                                                                                                                                                                         | 59 |
| 2.6.2. | Differentielle Anfärbung der Schwester-<br>chromatiden .....                                                                                                                                                         | 59 |
| 2.6.3. | Heterochromatin - Anfärbung .....                                                                                                                                                                                    | 60 |
| 2.7.   | Auswertung .....                                                                                                                                                                                                     | 61 |
| 2.8.   | Substanzen und Behandlungen .....                                                                                                                                                                                    | 61 |
| 2.8.1. | Testsubstanzen .....                                                                                                                                                                                                 | 61 |
| 2.8.2. | Positive Referenzsubstanzen: .....                                                                                                                                                                                   | 62 |
| 2.8.3. | Behandlung .....                                                                                                                                                                                                     | 62 |
| 2.9.   | Metabolische Aktivierung .....                                                                                                                                                                                       | 62 |
| 2.9.1. | Materialien für die metabolische<br>Aktivierung .....                                                                                                                                                                | 63 |
| 2.9.2. | Herstellung des Aktivierungsgemisches<br>(S9-Mix) aus der S9-Fraktion .....                                                                                                                                          | 64 |
| 2.9.3. | Behandlungsablauf bei direkter Zugabe<br>des S9-Mix zu den Blutkulturen .....                                                                                                                                        | 65 |
| 2.9.4. | Veränderter Behandlungsablauf bei in-<br>direkter Zugabe des S9-Mix im Dialyse-<br>schlauch .....                                                                                                                    | 65 |
| 2.9.5. | Arbeitsschritte beim Waschen der<br>Kulturen .....                                                                                                                                                                   | 66 |
| 2.10.  | Versuchsbedingungen und Abweichungen vom<br>Kultivierungsschema bei den Experimenten<br>zum Nachweis von numerischen Chromosomen-<br>aberrationen durch Zellteilungsstörungen,<br>Mikrokernen und Polyploidien ..... | 66 |

|         |                                                                                                                                                                                      |    |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.11.   | Versuchsaufbau und Versuchsplan .....                                                                                                                                                | 67 |
| 2.11.1. | Durchgeführte Versuche, aufgelistet<br>nach den Experimentalansätzen .....                                                                                                           | 67 |
| 2.11.2. | Übersicht Versuchsplan .....                                                                                                                                                         | 75 |
| 2.12.   | Statistische Analyse .....                                                                                                                                                           | 78 |
| 3.      | ERGEBNISSE .....                                                                                                                                                                     | 79 |
| 3.1.    | Kriterien bei der Auswertung der Versuche<br>zum Nachweis von strukturellen Chromosomen-<br>aberrationen und zur Bestimmung der Rate von<br>Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) .. | 79 |
| 3.1.1.  | Strukturelle Chromosomenaberrationen ...                                                                                                                                             | 79 |
| 3.1.2.  | Schwesterchromatidenaustausche (SCE) ...                                                                                                                                             | 81 |
| 3.1.3.  | Zusätzliche Parameter bei der Auswertung<br>struktureller Chromosomenaberrationen und<br>der SCE-Raten .....                                                                         | 81 |
| 3.2.    | Kriterien bei der Auswertung numerischer<br>Chromosomenaberrationen .....                                                                                                            | 82 |
| 3.2.1.  | Bestimmung der Mitoseindices .....                                                                                                                                                   | 82 |
| 3.2.2.  | Auswertung von Mikrokernen in Interphasen<br>von Lymphozyten .....                                                                                                                   | 83 |
| 3.2.3.  | Auswertung von Zentromerregionen<br>(C-Banden) .....                                                                                                                                 | 84 |
| 3.2.4.  | Auswertung von heterochromatischen Be-<br>reichen in Mikrokernen .....                                                                                                               | 84 |
| 3.2.5.  | Anzahl polyploider Metaphasen in 1.,<br>2. und 3. Mitosen .....                                                                                                                      | 85 |
| 3.3.    | Ergebnisse der Auswertung von struktu-<br>rellen Chromosomenaberrationen .....                                                                                                       | 85 |
| 3.3.1.  | Negativkontrollen .....                                                                                                                                                              | 85 |
| 3.3.2.  | Positivkontrollen .....                                                                                                                                                              | 86 |
| 3.3.3.  | Testsubstanzen .....                                                                                                                                                                 | 86 |

|         |                                                                                                                                      |     |
|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.4.    | SCE-Raten in Versuchen ohne und mit<br>metabolischer Aktivierung .....                                                               | 88  |
| 3.4.1.  | Negativkontrollen .....                                                                                                              | 88  |
| 3.4.2.  | Positivkontrollen .....                                                                                                              | 89  |
| 3.4.3.  | SCE-Raten nach Behandlung mit den<br>Testsubstanzen .....                                                                            | 90  |
| 3.5.    | Ergebnisse der Versuche zum Nachweis nume-<br>rischer Chromosomenaberrationen durch Zell-<br>teilungsstörungen und Polyploidisierung | 95  |
| 3.5.1.  | Arretierung von Mitosen in Metaphase ...                                                                                             | 95  |
| 3.5.2.  | Mikrokerne .....                                                                                                                     | 95  |
| 3.5.3.  | C-Banden und Chromozentren .....                                                                                                     | 97  |
| 3.5.4.  | Polyploidisierung .....                                                                                                              | 98  |
| 4.      | DISKUSSION .....                                                                                                                     | 103 |
| 4.1.    | Strukturelle Chromosomenaberrationen ...                                                                                             | 103 |
| 4.2.    | Schwesterchromatidenaustausche .....                                                                                                 | 106 |
| 4.3.    | Numerische Chromosomenaberrationen .....                                                                                             | 111 |
| 4.3.1.  | Der Nachweis von induzierten numerischen<br>Chromosomenaberrationen in Lymphozyten-<br>kulturen.....                                 | 119 |
| 4.4.    | Schlußbetrachtung .....                                                                                                              | 121 |
| 5.      | ZUSAMMENFASSUNG .....                                                                                                                | 127 |
| 6.      | LITERATUR .....                                                                                                                      | 130 |
| ANHANG: |                                                                                                                                      |     |
|         | Ergebnistabellen .....                                                                                                               | 167 |
|         | Abbildungen .....                                                                                                                    | 239 |

## 1. EINLEITUNG

Die Untersuchung von erbverändernden Wirkungen durch natürliche und vom Menschen geschaffene Umweltmutagene ist zu einem wichtigen Gebiet im Rahmen der Toxikologie geworden. Dabei ist die Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch Mutagene die Hauptursache von genetischen Defekten, entwicklungsbedingten Geburtsfehlern und wahrscheinlich auch von Krebserkrankungen (AMES, 1979; BARTSCH und TOMATIS, 1983; KALTER, 1975; MEYNE und LEGATOR, 1983).

### 1.1. Arten genotoxischer Wirkung

Physikalische (verschiedenen Strahlenarten), biologische (Viren) und chemische Agenzien sind die drei Kategorien, in die sich Mutagene einordnen lassen (OBE und NATARAJAN, 1980).

Mutagene Agenzien können unterschiedlichste Veränderungen des genetischen Materials hervorrufen. Nach der Art der Veränderungen unterscheidet man verschiedene Mutationstypen. Genmutationen sind Veränderungen an einzelnen Basenpaaren der DNS (Basenpaarsubstitutionen, Deletionen, Insertionen und Inversionen). Chromosomenmutationen sind strukturelle Veränderungen an den Chromosomen. Chromosomenabschnitte fehlen oder sind verdoppelt (Deletionen, Duplikationen) oder verschiedene Chromosomen haben untereinander Abschnitte ausgetauscht (Translokationen). Genommutationen betreffen die Anzahl der Chromosomen einer Zelle. Einzelne Chromosomen fehlen oder sind überzählig (Aneuploidien), oder der ganze Chromosomensatz ist verändert (Haploidie, Polyploidie). (OBE und NATARAJAN, 1980; RIEGER et al., 1976).

Gen- und Chromosomenmutationen sind Veränderungen an der DNA, die unmittelbar durch DNA-schädigende Agenzien oder über indirekte Mechanismen (fehlerhafte Reparatur oder Replikation) ausgelöst werden.

Genommutationen sind Mutationen, die bei Störungen in der Zellteilung durch Nichtverteilung (Polyploidie) oder Fehlverteilung (Aneuploidie) der Chromosomen entstehen.

Agenzien, die strukturelle Chromosomenaberrationen (Chromosomenmutationen) induzieren, können auch Punktmutationen (Genmutationen) verursachen, die mikroskopisch nicht sichtbar sind (AUERBACH, 1976).

### 1.2. Chemische Mutagene

Chemikalien haben als mutagene Noxen die größte Bedeutung.

Der prozentuale Anteil der durch Chemikalien ausgelösten Krebserkrankungen wird mit etwa 90 % angegeben. (DOLL und PETO, 1981; JÜDES, 1979).

Die Bedeutung der Chemikalien für den Menschen wird aus folgenden Zahlen ersichtlich: neben Tausenden von natürlichen Substanzen, denen der Mensch ausgesetzt ist, gibt es derzeit etwa 70 000 synthetische Chemikalien und jährlich kommen etwa 1000 hinzu (AMES, 1979; HOLLSTEIN et al., 1979).

Nur einige Tausend Substanzen sind bisher auf Mutagenität und/oder Kanzerogenität getestet worden. Ergebnisse von über 2600 Chemikalien im Salmonella/Ames Test wurden bisher veröffentlicht und Hunderte wurden mit anderen Testverfahren geprüft. Die Zahl der als mutagen und als kanzerogen erkannten Substanzen nimmt ständig zu (GEBHART, 1977; IARC-MONOGRAPHIEN Bd. 1 (1971) bis Bd. 29 (1982)).

Zu den synthetischen chemischen Mutagenen gehören Substanzen aus dem Bereich der Industriechemikalien, Pestizide, Haarfärbemittel, Kosmetika und Drogen. Gemische chemischer Mutagene sind der Tabakrauch und Verunreinigungen in Luft und Wasser (AMES, 1979; AMES et al., 1973; HOLLSTEIN et al., 1979; OBE, 1981; OBE und NATARAJAN, 1980).

Die am besten untersuchten Chemomutagene sind alkylierende Substanzen. Hierzu gehören Arzneimittel wie Zytostatika und Immunsuppressiva. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Mutagenitätsprüfung an einer Vielzahl von Chemikalien findet sich bei GEBHART (1977).

Die Bedeutung der mutagenen und/oder kanzerogenen Eigenschaften von Naturstoffen wird leicht unterschätzt. So sind von Pflanzen erzeugte chemische Verbindungen bekannt, die die DNA schädigen (FAHRIG, 1982; NAGAO et al., 1981; ROBISCH et al., 1982; SPEIT et al., 1980; STICH et al., 1981, 1982), oder den Teilungsablauf der Zelle beeinflussen und zu Genommutationen führen können (EIGSTI und DUSTIN, 1955; HENRICH et al., 1980; KRISHAN, 1972).

Mutagene Verbindungen können durch die Verarbeitung von Pflanzenteilen zu Nahrungsmittelprodukten entstehen (siehe STICH et al., 1981). Für Karamel und karamelisierte Zucker und für Röstprodukte der Kakaobohne und des Kaffees konnten mutagene Wirkungen nachgewiesen werden (RENNER und MÜNZNER, 1982; STICH et al., 1981).

Über die mutagenen Eigenschaften von natürlichen Substanzen, die bei Tieren vorkommen, ist noch nicht viel bekannt. Ferritin aus der Milz von Pferden und sogar natürlich vorkommende Zellbestandteile wie Kernbasen und ihre entsprechenden Nukleoside bewirken Schädigungen an den Chromosomen (ANDERSON et al., 1981; PERRY, 1983).

### 1.3. Beziehungen zwischen genotoxischen und tumorigenen Wirkungen

Mutationen in somatischen Zellen (wie z.B. den Lymphozyten) können nicht auf die Nachkommen vererbt werden. Die Bedeutung der somatischen Mutationen liegt in einer Erhöhung des Krebsrisikos. Krebsentstehungstheorien gehen davon aus, daß Krebs durch Schädigungen des genetischen Materials in Körperzellen verursacht wird (AMES, 1979; BAUER, 1928; BOVERI, 1914; CAIRNS, 1978; HIATT et al., 1977; SHAW und LEAL, 1978).

Die Korrelation zwischen der kanzerogenen und mutagenen Eigenschaft von Substanzen wurde in vielen Untersuchungen überprüft (DE SERRES und ASHBY, 1981; HARRIS, 1983).

Im Salmonella/Mikrosomen Test erwiesen sich 79% (BARTSCH und TOMATIS, 1983) bis 90% (MC CANN und AMES, 1976; MC CANN et al., 1975) der Kanzerogene auch als mutagen. Diese enge Korrelation zwischen mutagener und kanzerogener Aktivität ist ein wichtiger Aspekt bei der Analyse somatischer Mutationen. Ein entsprechender Zusammenhang konnte für den Tabakrauch und für den Genuß alkoholischer Getränke demonstriert werden (HOPKIN und EVANS, 1979; OBE, 1981; OBE und RISTOW, 1979).

Nach der Zweistufentheorie der Krebsentstehung unterscheidet man nach primären (Tumorinitiation) und sekundären (Tumorpromotion) krebsauslösenden Mechanismen (CHANG et al., 1978).

In dieser Arbeit ist der Begriff "Kanzerogen" so definiert, daß damit sowohl initiiierende als auch promovierende Faktoren der Tumorbildung gemeint sein können, obwohl der Begriff heute mehr im Sinne von "initiiierend" verstanden wird.

Tumorinitiiierende Wirkungen werden bei der Mehrzahl der Substanzen auf eine Schädigung der DNA zurückgeführt. Diese Schädigungen können Punktmutationen oder Chromosomenmutationen sein (RADMANN und KINSELLA, 1980; WEINBERG 1983).

Tumorpromovierende Wirkungen werden unter anderem "epigenetischen Mechanismen" zugeordnet, wonach beispielsweise die Genexpression und/oder -regulation verändert ist (CLAYSON, 1981; MARX, 1983; STRAUS, 1981; WEISBURGER und WILLIAMS, 1981).

Die Untersuchungen der qualitativen Beziehungen zwischen Kanzerogenität und Mutagenität (im Sinne einer DNA-schädigenden Aktivität) basieren auf Chemikalien, die für den Menschen als kanzerogen bekannt, oder für die im Tierversuch ein kanzerogenes Potential nachgewiesen werden konnte. Nach der Auswertung (Stand vom Mai 1982) der IARC- Monographien sind bisher 532 Chemikalien auf ihr kanzerogenes Risiko

analysiert worden. Danach sind 40 Substanzen als definitiv kanzerogen für den Menschen anzusehen und 130 Substanzen sind als kanzerogen einzustufen, die bei Nagern ausreichend genau untersucht worden sind (BARTSCH und TOMATIS, 1983).

#### 1.4. Methoden zum Nachweis genotoxischer Wirkungen

Die meisten karzinogenen Substanzen sind in verschiedenen Kurzzeit-Tests untersucht worden, zu denen auch die Mutagenitätstests gerechnet werden. Zur Mutagenitätsprüfung wurden über 100 Testsysteme entwickelt, die in folgenden Gruppen zusammengefaßt werden können:

- biochemische Nachweismethoden
- Tests unter Verwendung prokaryoter Mikroorganismen
- Tests unter Verwendung eukaryoter Mikroorganismen
- Tests mit höheren Pflanzen
- Tests mit Säugerzellen in Kultur
- zytogenetische Tests an Säugern
- Tests mit Säugern

(EVANS und LLOYD, 1978; FISHBEIN et al., 1970; HOLLAENDER und DE SERRES, 1978; HOLLSTEIN et al., 1979; KILBEY et al., 1977, MADLE und OBE, 1980).

Langzeitstudien in Tierversuchen sind immer noch das sicherste Mittel zur Aussage über die kanzerogenen Wirkungen von Chemikalien am Tier. Die Entwicklung und Anwendung einer angemessenen Kombination von Kurzzeittests kann aber wesentlich zur Vorhersagbarkeit oder Absicherung von kanzerogenen Effekten beitragen.

Die Mutagenitätstests haben ihre Bedeutung nicht nur als Kurzzeittests für die Vorhersagbarkeit einer kanzerogenen Wirkung, sondern sind in erster Linie Nachweisverfahren für die erbverändernde Wirkung von Substanzen.

Ein hoher Prozentsatz der Mutagene wird die Keimzellen ebenso wie die Somazellen erreichen. Schädigungen des genetischen Materials in den Zellen der Keimbahn können so unterschiedliche Folgen haben wie verminderte Fertilität, Absterben befruchteter Eizellen in der Keimungs- und Embryonalphase, dominante Erbkrankheiten und lebensfähige Individuen mit schwerwiegenden Syndromen. Rezessive Gendefekte, die bei heterozygotem Auftreten keine Auswirkungen auf das Individuum haben, können sich in einer belasteten Population akkumulieren und in nachfolgenden Generationen zu einer großen Belastung werden (ABRAHAMSON, 1979; EHRENBURG, 1979; HOOK und PORTER, 1977; NEEL, 1979).

#### 1.4.1. Humanlymphozyten als Testsystem zum Nachweis von mutagenen Agenzien

Kurzzeittests mit Mikroorganismen, wie der Ames Test mit *Salmonella typhimurium* ermöglichen einen schnellen und kostengünstigen Nachweis von Mutagenen. Der Nachteil liegt darin, daß die Versuchsbedingungen bei diesen Verfahren sehr weit von der Komplexität höher entwickelter Organismen entfernt sind. Unter diesem Aspekt bietet die Analyse struktureller Chromosomenaberrationen in somatischen Zellen eine Möglichkeit, über die tatsächliche mutagene Belastung des Menschen genauere Aussagen zu machen. Menschen selbst können genetischen Experimenten nicht ausgesetzt werden. Eine indirekte Methode zum Nachweis einer möglichen mutagenen Aktivität von Agenzien auf den Menschen ist die Analyse induzierter struktureller Chromosomenaberrationen in peripheren Lymphozyten (EVANS und LLOYD, 1978; OBE et al., 1975; OBE und NATARAJAN, 1980).

Lymphozyten können in vitro veranlaßt werden, das G<sub>0</sub>-Stadium zu beenden und in den Zellzyklus einzutreten, so daß die Chromosomen nach Schäden analysiert werden können, die in vivo induziert worden sind (OBE und NATARAJAN, 1980; OBE et al., 1975). Die akute und chronische Exposition von Menschen mit Strahlen oder Drogen kann zu erhöhten Aberrationsraten in den peripheren Lymphozyten führen (AWA, 1974; EVANS et al., 1979; OBE und RISTOW, 1979; OBE und MADLE 1981).

Eine weitere Nachweismöglichkeit ist die Untersuchung auf strukturelle Chromosomenaberrationen in vitro. In diesem Fall wird das Blut klinisch gesunder Spender in vitro mit der zu untersuchenden Substanz behandelt. Die Aberrationshäufigkeiten in den Testkulturen werden mit den Häufigkeiten in unbehandelten Kontrollen verglichen. Mit mutagenen Substanzen behandelte Kulturen dienen als Positivkontrolle. Dieser Test ist dann von Bedeutung, wenn die Substanzen ohne und mit exogener metabolischer Aktivierung geprüft werden. Zellen wie primäre embryonale Fibroblasten, primäre Leberzellen und einige chinesische Hamsterzelllinien haben ein eigenes Aktivierungspotential in vitro (RÜDIGER et al., 1979; ABE und SASAKI, 1982 a). Humanlymphozyten sind wie die meisten permanenten Zelllinien (CHO, CH V79, HeLa) metabolisch relativ inaktiv. Daher ist in diesen Zellen die Möglichkeit der Substanzaktivierung in vitro ein Mittel, um sogenannte Promutagene, die durch den Stoffwechsel in mutagene Substanzen überführt werden, nachweisen zu können. Einige dieser Substanzen sind Cyclophosphamid, Dimethylnitrosamin, Aflatoxin B<sub>1</sub> und Benzpyren (ABE und SASAKI, 1982 a; BIMBOES und GREIM, 1976; DEAN et al., 1980).

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten der exogenen metabolischen Aktivierung mit Säugerenzymen. Dazu gehören der „host mediated assay“, die Kokultivierung von stoffwechselinaktiven Indikatorzellen mit stoffwechselaktiven Zellen (cell mediated activation), die Aktivierung durch Leberperfusion und die Aktivierung durch Leberhomogenate (ABE et al., 1981; MADLE und OBE, 1980, 1981; MICHALOPOULOS et al., 1981; WOJCIECHOWSKI et al., 1981).

Die Aktivierung durch die S9-Fraktion von Leberhomogenaten ist das zur Zeit am weitesten verbreitete Verfahren, das im Ames Test routinemäßig eingesetzt wird. In gleicher Weise wird die S9-Fraktion in permanenten Säugerzelllinien als Aktivierungssystem benutzt (AU et al., 1980, BASLER et al., 1982; MADLE und OBE, 1980; MORIMOTO 1983, NATARAJAN et al., 1976).

In Säugerzellen und besonders in Humanlymphozyten wirkt die direkte Zugabe der Lebermikrosomenfraktion zytotoxisch und ist deshalb nur mit einer begrenzten Expositionsdauer einzusetzen (1 - 3 Stunden). Mit dem Entfernen der Enzyme durch den Wechsel des Kulturmediums werden die Substanzen und die möglicherweise gebildeten Metaboliten ebenfalls mitausgewaschen.

Eine der Möglichkeiten, die Substanzen und Metaboliten länger auf die Zellen einwirken zu lassen, ist der Einschluß des Aktivierungsgemisches in Dialyseschläuchen. Nach dem Entfernen der Dialyseschläuche können die Substanzen und Metaboliten in der Kultur verbleiben und über einen längeren Zeitraum auf die Zellen einwirken. Das hat den Vorteil, daß Metabolite mit einem schwachen mutagenen Potential oder mutagene Metabolite, die nur in geringen Konzentrationen gebildet worden sind, eine nachweisbare Aktivität entfalten können. Zudem werden die zytotoxischen Einflüsse durch die S9-Fraktion auf die Zellen reduziert (MADLE, 1981; MADLE und OBE, 1977, 1980).

Eine weitere zytogenetische Methode zum Nachweis induzierter Mutationen beim Menschen ist die Auswertung von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) in menschlichen Lymphozyten. SCEs stellen einen symmetrischen Austausch zwischen den Schwesterchromatiden eines Chromosoms dar, ohne daß daraus eine Veränderung der Chromosomenmorphologie resultiert. Diese Austausche werden in zweiten Mitosen nach Einbau von Bromdesoxyuridin (BUDR), einem Basenanalogen des Thymins sichtbar. Die SCE-Technik gilt als sensitiver und schneller Indikatortest für mutagene Substanzen. Der Vorteil der Methode beruht darauf, daß die SCEs relativ häufigere Ereignisse in den Zellen darstellen als strukturelle Chromosomenaberrationen. In Zellkulturen ist die spontane SCE-Rate um

mehr als das Hundertfache höher als die Spontanrate an Brüchen (BEEK und OBE, 1975; GEBHART, 1981; GALLOWAY und WOLFF, 1979; MC FEE und SHERILL, 1979).

Ein Nachteil der SCE-Technik ist, daß die genetische Bedeutung der SCEs nicht bekannt ist (LATT et al., 1981).

Viele Agenzien, die zu einer Erhöhung der SCE-Rate führen, induzieren auch strukturelle Chromosomenaberrationen. Als zusätzliches zytogenetisches Testsystem hat sich der SCE-in vitro-Test als nützlich erwiesen. Mutagene wie Trenimon, Methyl- und Ethylmethansulfonat (MMS und EMS), Mitomycin C (MMC) und Cyclophosphamid erhöhten in vergleichenden Studien die SCE-Rate. (BEEK und OBE, 1975; CARRANO et al., 1978; PERRY und EVANS, 1975).

Durch die Beeinflussung der Kultivierungsbedingungen können ebenfalls erhöhte SCE-Raten induziert werden. Zellzyklusdauer, Temperatur, Sauerstoffanteil und Substanzen, die in die Replikation eingreifen, sind Faktoren, die auf die SCE-Rate einwirken können. Solche Einflüsse führen maximal zu einer Verdoppelung der SCE-Rate. (ABDEL FADIL et al., 1982; CLEAVER, 1981; GUTIERREZ und LOPEZ-SAEZ, 1982; GUTIERREZ et al., 1981; LATT, 1981; SNOPE und RARY, 1979; SPEIT, 1980). In gleichem Umfang kann durch eine der wirksamsten tumorpromovierenden Substanzen, dem 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-azetat (TPA), die SCE-Rate modifiziert werden. KINSELLA und RADMAN (1978); KYRTOPOULOS und ATHANASSIOU (1981) und NAGASAWA und LITTLE (1979, 1981) konnten mit TPA erhöhte SCE-Frequenzen induzieren.

Die SCE-Analyse kann ebenso wie die Analyse struktureller Chromosomenaberrationen als in vivo-Test oder als in vitro-Test mit metabolischer Aktivierung zum Nachweis von Promutagen eingesetzt werden.

#### 1.5. Genommutationen und deren Nachweis

Numerische Chromosomenaberrationen können durch Colchizin und Vinca-Alkaloide induziert werden. Ebenso wurde für eine Reihe von Carbamaten (IARC-Monographie Nr. 12, 1976; OENFELT und KLASTERSKA, 1983), für das Herbizid Aventox SC (Cyanursäure) (BADR 1983), für Adriamycin (SORA et al., 1983), Cannabisderivate (delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC)) (HENRICH et al., 1980) und Lachgas (N<sub>2</sub>O) (WEGNER, Dissertation 1979) die Fähigkeit zur Mitosearretierung und Polyploidisierung nachgewiesen.

Numerische Mutationen in Zellen der Keimbahn führen zu unmitttelbaren und drastischen Folgen.

Ein Drittel aller Spontanaborte sind auf Genommutationen zurückzuführen. Etwa sechs von Tausend Neugeborenen weisen

Chromosomenanomalien auf. Fünf davon sind Träger einer Genommutation. Somit ist dieser Mutationstyp der pathogenetisch häufigste. Allein unter diesem Gesichtspunkt ist die Untersuchung der Induktion von Genommutationen durch relevante Mutagenitätstests von großer Wichtigkeit (GEBHART, 1977; HOOK, 1983; SANKARANARAYANAN, 1979).

Möglicherweise beeinflussen Genommutationen in Somazellen die Tumorentwicklung. Tumorzellen haben häufig einen aneuploiden Chromosomensatz. Es ist jedoch nicht möglich, eine Aussage zu treffen, ob die Aneuploidie eine Folge der Transformation zu einer Tumorzelllinie ist, oder ob Aneuploidien an der Zelltransformation mitbeteiligt sind. Ein denkbarer Mechanismus ist, daß überzählige Chromosomen zur Verdopplung der Gendosis eines aktivierten Oncogens führen können (KLEIN, 1981; YUNIS, 1983).

An Ratten, die mit Estradiol behandelt waren, wurden Hyperplasien der Hypophyse beobachtet, aus denen sich Hypophysentumore entwickelten. Einige abnorme Stammlinien mit Markerchromosomen erschienen schon in einem frühen Stadium der hyperplastischen Reaktion der Hypophyse. Später waren die Tumore durch einen Anstieg in der Zahl aneuploider Zellen charakterisiert (MALKOVA et al., 1977).

Während die Induktion von Genmutationen und Chromosomenmutationen mit einer Vielzahl von Testmethoden untersucht werden kann, sind Genommutationen nur in wenigen Testsystemen zu überprüfen (HOFFMAN, 1981).

Relativ gut nachweisbar sind numerische Chromosomenaberrationen an Pilzkulturen (*Aspergillus*, *Neurospora*, *Saccharomyces*, *Sordaria*), für die schnelle und einfach zu handhabende Verfahren entwickelt worden sind (ALLI und PARRY, 1983; KÄFER et al., 1982; SCOTT et al., 1982; SORA et al., 1983).

In Keimzellpräparaten (bei Einzelpräparation der Oozyten) und Zellkulturen sind Genommutationen bei der Chromosomenanalyse durch die Bestimmung der Chromosomenzahl (Auswertung hypo- und hyperploider Zellen) zu erfassen (CHRISMAN, 1974; CHRISMAN und HINKLE, 1974).

Bei Säugern und an Säugerzellen ist die Fluoreszenzanfärbung des Y-Chromosoms für die Entwicklung eines Testsystems zum Nachweis von Aneuploidien genutzt worden. Durch das Auftreten von 2 fluoreszierenden Y-Chromosomen (YFF-Methode) können Chromosomenfehlverteilungen nachgewiesen werden (KAPP und JACOBSON, 1980; TENCHINI et al., 1981, 1983).

Dominant-Letal Test (DLT), Mikrokerntest in vivo (MNT) und Anaphasepräparationen von Zellen eignen sich nur begrenzt zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen. Im DLT

ist keine Unterscheidung von anderen Mutationstypen möglich und die Auswertung von Mikrokernen und aberranten Anaphasen allein erlaubt gewöhnlich keine Aussage, ob strukturelle Chromosomenaberrationen oder Zellteilungsstörungen dafür verantwortlich sind (BATEMAN und EPSTEIN, 1971; EPSTEIN et al., 1972; HEDDLE, 1977; HEDDLE und BRUCE, 1977; HOLLSTEIN et al., 1979; JENSSEN und RAMEL, 1980; SALAMONE et al., 1980; SCHMID, 1975, 1976; YAMAMOTO und KIKUCHI, 1981).

Diese begrenzte Nachweisfähigkeit von numerischen Chromosomenaberrationen führte zu der Entwicklung von neuen Verfahren, die definitiv den Mutationstypus der Genommutationen erfassen.

PARRY et al. (1982, 1983) entwickelten eine differentielle Anfärbung von Chromosomen und Spindelapparat, wodurch bei aberranten Anaphasen Störungen im Spindelaufbau sichtbar gemacht werden können.

VALADAUD-BARRIEU (1983) konnte nachweisen, daß durch Mitosegifte induzierte Mikrokerne signifikant größer sind als von strukturellen Chromosomenaberrationen abgeleitete Mikrokerne.

Bei HEDDLE et al. (1978) und NATARAJAN und OBE (1980) ist die Verwendung des Mikrokerntests zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen in Zellkulturen beschrieben. Die Induktion von Mikrokernen in Humanlymphozyten kann auch als spezifischer Nachweis von Chromosomenfehlverteilungen verwendet werden. Als Unterscheidungskriterium für die Entstehung von Mikrokernen kann das Vorhandensein von zentromernahem Heterochromatin verwendet werden. Mikrokerne, die als Folge von nicht verteilten Fragmenten nach strukturellen Chromosomenaberrationen entstehen, haben keinen Zentromerbereich. Dagegen haben Mikrokerne infolge von Fehlverteilungen ganzer Chromosomen Zentromerregionen.

In Metaphasechromosomen lassen sich die heterochromatischen Bereiche der Zentromerregion durch spezielle Färbetechniken differentiell anfärben (ARRIGHI und HSU, 1971; PARDUE und GALL, 1970, SUMNER, 1972; SUMNER et al., 1971). Durch diese Färbung erscheint die heterochromatische Zentromerregion dunkler gefärbt, als der Rest des Chromatins (C-Bandentechnik). Das Ausmaß und die Verteilung des heterochromatischen Bereichs um das Zentromer variiert innerhalb des Karyotyps und selbst zwischen den homologen Chromosomen. Die C-Bandentechnik wird in der Humangenetik angewendet und für Untersuchungen über das Trennungsverhalten der Chromatiden in der Mitose genutzt (GAAL et al., 1981; MATTEI et al., 1981; NERI et al., 1982; VIG, 1982).

Chromozentren sind stark kondensierte Chromosomensegmente des Interphasekerns, die aus Heterochromatin bestehen (RIEGER et al., 1976). Die Chromozentren des Interphasekerns lassen sich durch die C-Bandenfärbung in gleicher Weise differentiell anfärben, wie die Zentromerbereiche der Metaphasechromosomen. Es wird deshalb angenommen, daß die Chromozentren mit den C-Banden der Metaphasechromosomen identisch sind. Diese Annahme wird durch die Arbeit von BRENNER et al. (1981) gestützt, in der durch Immunofluoreszenzanfärbung und elektronenmikroskopische Aufnahmen einzelne Flecken in Interphasekernen nachgewiesen wurden. Diese als mutmaßliche Kinetochoren bezeichneten Flecken entsprachen den heterochromatischen Bereichen im lichtmikroskopischen Bild. Auf der Basis dieser Annahme wendeten OBE und BEEK (1975) bereits die C-Bandenfärbung an, um an Mikrokernen ableiten zu können, ob nach Behandlung mit Röntgenstrahlen Chromosomenbruchstücke oder ganze Chromosomen zu Mikrokernen geführt haben.

Chromozentren sind deshalb ein Mittel, um nachweisen zu können, ob Mikrokerne durch Störungen im Ablauf der Zellteilung induziert werden. Ein Mikrokerntest in vitro mit der Auswertung von Chromozentren ist deshalb zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen geeignet. Ein niedriger Anteil von Mikrokernen mit Chromozentren ist zu erwarten, wenn Substanzen ausschließlich oder überwiegend durch Schädigungen an der DNA zu chromosomalen Aberrationen führen.

Mit diesem Verfahren kann ohne Chromosomenanalyse zwischen Chromosomenmutationen und Genommutationen unterschieden werden.

## 1b. Substanzen

1b.1. In der vorliegenden Arbeit wurden Methyl 2-benzimidazolcarbammat, Diethylstilbestrol und die natürlich vorkommenden Steroide Estradiol, Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon an menschlichen Leukozyten in vitro im Hinblick auf die Induktion struktureller Aberrationen, SCEs und numerischer Aberrationen untersucht.

Nachfolgend sind die Substanzen chemisch kurz charakterisiert. Aufgeführt sind die Registriernummern des "Chemical Abstracts Services" (CAS- Nr.), die Molekulargewichte (MG), sowie die Summen- und die Strukturformeln.

Bisher vorliegende Informationen aus Untersuchungen über genotoxische Wirkungen und aus anderen Kurzzeittests zur Abschätzung eines mutagenen und/oder karzinogenen Potentials sind in Tabellen 1 - 4 zusammengestellt.

### 1b.2. Methyl 2-benzimidazolcarbamat (MBC)

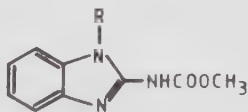
MBC ist das stabile Hydrolyseprodukt des Fungizids Methyl-1-(butylcarbamoyl)-2-benzimidazolcarbamate (Benomyl (hier verwendete Abkürzung BEN)). BEN ist instabil und geht durch Hydrolyse spontan in die Wirkform des MBC über, das die im Organismus vorliegende Wirksubstanz ist (HOLDEN et al., 1980; KAPPAS, 1981 b).

MBC: 1H-Benzimidazol-2-ylcarbamic acid methyl ester besteht aus 2 Komponenten: dem heterozyklischen Ringsystem Benzimidazol und der Carbamatgruppe:

CAS- Nr.: 10605 - 21 - 7

MG: 191,18

Summenformel:  $C_9 H_9 N_3 O_2$



MBC: R = OH

BEN: R =  $CONH(CH_2)_3CH_3$

Benomyl, MBC und verwandte Benzimidazolcarbamate dienen als Fungizide, Acarizide und in der Veterinärmedizin als Anthelmintika. Sie erhöhen die biologische Oxidation von Abwässern und Düngemitteln (HOLDEN et al., 1980; KAPPAS, 1981 b; MERCK INDEX, 1976). Verwandte Benzimidazolcarbamate wurden auf ihren Einsatz in der Medizin als Zytostatika in der Krebstherapie getestet, wobei nachgewiesen wurde, daß einige dieser Substanzen die Zellproliferation hemmen (DE BRABANDER et al., 1976 b; WHEELER et al., 1982).

In der bei SEILER (1975) erwähnten Krebsstudie mit MBC, die von dem Hersteller von Benomyl durchgeführt worden ist, konnten keine Hinweise auf karzinogene Wirkungen im Labor-tier ermittelt werden. Aus einem Bericht von SALMINEN und KIVELÄ-IKONEN (1982) geht hervor, daß durch wiederholte Langzeitstudien an Mäusen die Kanzerogenität von Benomyl als Induktor von hepatozellulären Tumoren gesichert ist.

Die in den Tabellen 1 bis 1c dargestellten Ergebnisse ergeben für die Induktion von Mutationen durch MBC folgendes: (a) MBC induziert Genmutationen (Basenpaarsubstitution) in Bakterien, Fungi und Somazellen von Säugern in vivo (b) MBC induziert non-disjunction in Fungi (c) MBC arretiert Mitosen und führt zu aberranten Anaphasen (d) MBC induziert Mikrokern in vivo (e) Die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen durch MBC ist nicht gesichert (f) Der Einfluß von MBC auf die SCE-Rate wurde bisher nicht untersucht.

### 1b.3. Diethylstilbestrol (DES)

DES ist ein künstliches Estrogen, das verbreitet als Nahrungsmittelbeigabe in der Viehzucht eingesetzt und als postkoitales Kontrazeptivum von Frauen mißbräuchlich verwendet wurde. Außerdem wurde DES in der Hormontherapie bei Patienten mit Prostatakarzinom oder fortgeschrittenem Brustkrebs indiziert (FLOCKS et al., 1955; KENNEDY und NATHANSON, 1953). Es wird im Magen-Darm Trakt leicht resorbiert, in der Leber langsam inaktiviert und durch Urin und Fäces ausgeschieden. Analog zu DES werden DES-dipropionat (DES-diprop.) und DES-diphosphat (DES-diphos.) verwendet.

DES: (E) - 4,4 - (1,2 Diethyl-1,2 ethendiyl) bisphenol gehört zu den Stilbenderivaten:

CAS- Nr.: 56 - 53 - 1

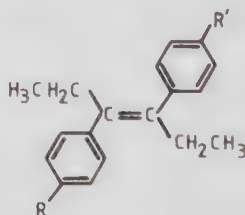
MG: 268,34

Summenformel:  $C_{18} H_{20} O_2$

DES: R und R' = OH

DES-diprop.: R und R' =  $OCOC_2H_5$

DES-diphos.: R und R' =  $OPO_3H_2$



HERBST et al. (1971) brachten DES mit dem Auftreten von Tumoren des Genitaltrakts junger Frauen in Verbindung, deren Mütter während der Schwangerschaft DES verabreicht wurde. Diese Wirkung wurde durch klinische Studien (NOLLER und KURLAND, 1976) und in Tierexperimenten (MC LACHLAN, 1977) bestätigt. DES wird als kanzerogen für den Menschen eingestuft (IARC Monographie Nr. 21, 1979). Die Wirkungsweise von DES als Kanzerogen ist unbekannt.

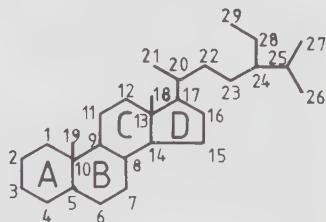
Untersuchungen in Testsystemen zum Nachweis von Mutationen führten zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen (Tabellen 2 - 2h): (a) DES induziert keine Genmutationen in Bakterien, Fungi und Säugerzellen (einige widersprüchliche Ergebnisse) (b) Die Ergebnisse zur Induktion von non-disjunction in Fungi sind uneinheitlich (c) DES arretiert Mitosen und führt zu aberranten Anaphasen (d) Die Induktion von Mikrokernen oder strukturellen Aberrationen ist nicht gesichert (e) Der Einfluß von DES auf die SCE-Rate ist unklar.

#### 1b.4. Natürlich vorkommende Steroidhormone

Die männlichen und weiblichen Geschlechtsorgane, die Nebennieren und die Plazenta produzieren steroidale Hormone. Sie dienen der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Strukturen, die direkt oder indirekt mit der Reproduktion verbunden sind. Von den drei prinzipiellen Typen der beteiligten Hormone haben die Androgene bestimmte Aufgaben in der reproduktiven Physiologie im männlichen Organismus und die Estrogene und Progestagene vergleichbare Aufgaben im weiblichen Organismus (MARTINDALE, 1982).

Steroidhormone sind von dem Grundgerüst des Sterans abgeleitete Substanzen. In dieser Arbeit wurden von den Estrogenen Estradiol und Estron, von den Gestagenen Progesteron und von den Androgenen Testosteron und Androstanolon untersucht:

##### A. Steroidgrundgerüst (Steran):

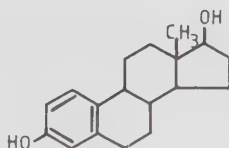


##### B. Estradiol (Estradiol-17-β):

CAS- Nr.: 50 - 28 - 2

MG: 272,37

Summenformel:  $C_{18} H_{24} O_2$

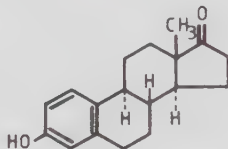


C. Estron (3 Hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-on):

CAS- Nr.: 53 - 16 - 7

MG: 270,36

Summenformel:  $C_{18} H_{22} O_2$

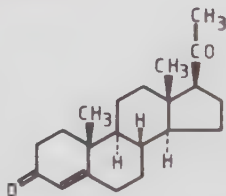


D. Progesteron (Pregn-4-en- 3,20-dion):

CAS- Nr.: 57 - 83 - 0

MG: 314,45

Summenformel:  $C_{21} H_{30} O_2$

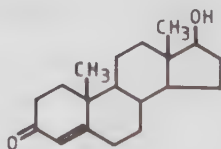


E. Testosteron (17β-Hydroxyandrost-4-en-3-on):

CAS- Nr.: 58 - 22 - 0

MG: 288,41

Summenformel:  $C_{19} H_{28} O_2$

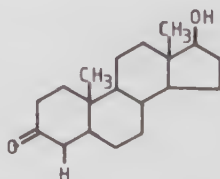


F. Androstanolon (17β-Hydroxy-5α-androstan-3-on):

CAS-Nr.: 521 - 18 - 6

MG: 290,43

Summenformel:  $C_{19} H_{30} O_2$



Sexualsteroiden gelten als mögliche Kanzerogene. Starke Hinweise zur Kanzerogenität von Hormonen gibt es für konjugierte Estrogene; von den Estrogenen, Gestagenen und Androgenen muß eine kanzerogene Wirkung angenommen werden. Das Gleiche gilt für einige Derivate der natürlichen Sexualsteroiden, die in oralen Kontrazeptiva oder in Anabolika Verwendung finden. Aus epidemiologischen Studien am Menschen und aus Laborver-

suchen am Tier sind sowohl hemmende als auch fördernde Eigenschaften für das Auftreten von Tumoren durch einige Steroidhormone bekannt (IARC-MONOGRAPHIEN Nr.6, 1974; Nr.21, 1978 und Ergänzungsband Nr.4, 1982).

Steroidhormone wurden in Mutagenitätstests umfangreich untersucht. Einige Autoren unterscheiden nach endogenen Hormonen und verschiedenen Derivaten der Hormone, andere nach der Hormonwirkung der Substanzen. In der Literaturübersicht ist nur eine Trennung nach natürlich vorkommenden Sexualsteroiden und nach Steroidderivaten vorgenommen worden. Für den Einzelfall ist, soweit aus den Arbeiten ersichtlich, die Substanz oder das Präparat angegeben worden. Eine weitergehende Unterteilung scheint für die Literaturübersicht von mutagenen oder damit in Beziehung stehenden Effekten nicht sinnvoll und erforderlich.

Die Untersuchungen mit den natürlich vorkommenden Steroidhormonen sind in den Tabellen 3 - 3c aufgelistet: (a) Für diese Substanzgruppe konnte die Induktion von Genmutationen nicht nachgewiesen werden (b) Die Resultate hinsichtlich der Analyse struktureller Aberrationen sind widersprüchlich. Die Tendenz ist, daß diese Substanzen keine strukturellen Aberrationen induzieren (c) Die Fähigkeit zur Induktion von SCEs ist noch nicht ausreichend überprüft worden. Von Mutagenen induzierte SCE-Raten können durch Steroide beeinflußt werden (d) Der Einfluß von Steroiden auf die Zellteilung ist in zahlreichen Studien belegt. Aberrante Ana- und Telophasen sind in mitotischen und meiotischen Zellteilungen beobachtet worden (e) Die Induktion von Genommutationen ist nicht gesichert.

#### 1b.5. Hormonale Kontrazeptiva und andere Sexualsteroid-derivate

Diese mit den natürlichen Sexualsteroiden verwandten Substanzen wurden mit in die Literaturübersicht aufgenommen, weil sie als Arzneimittel und hormonale Kontrazeptiva, (besonders die oralen Kontrazeptiva (OC)) intensiv auf mutagene Wirkungen untersucht worden sind.

Die Beurteilung der Ergebnisse lassen unter Umständen auch Schlüsse auf die Wirkungen von endogenen Sexualsteroiden zu. Die verabreichten Substanzen entsprechen weitgehend den natürlichen Sexualsteroiden und werden im Körper zum Teil in natürliche Steroide umgewandelt.

Orale Kontrazeptiva (OC) bestehen aus Derivaten von Estrogenen (Ethinyloestradiol, Mestranol) und Gestagenen (die z.T. androgene Partialwirkungen haben).

Synthetische Estrogene und Gestagene entsprechen dem Estradiol oder Progesteron bei denen zusätzliche Gruppen am Steroidgrundgerüst (siehe 1b.4.) eingeführt sind:

|                                 |                                     |
|---------------------------------|-------------------------------------|
| z.B. an Position C <sub>3</sub> | -OCH <sub>3</sub>                   |
| an Position C <sub>4,5,6</sub>  | -CH <sub>3</sub>                    |
| an Position C <sub>6</sub>      | -Cl                                 |
| an Position C <sub>17</sub>     | -OH, -CCH, oder -OCOCH <sub>3</sub> |

Natürliches Estrogen und Progesteron wird bei oraler Gabe in der Leber zu 17-Oxo- oder 16-Hydroxy-Metaboliten oder durch Konjugation der 3- oder 17-Hydroxygruppen zu Sulfaten oder Glukuroniden schnell inaktiviert. Die zusätzlich eingeführten Gruppen hemmen die Wirkung von Enzymen, so daß die synthetischen Steroide die Zielorgane erreichen können.

OC sind vielfach auf mutagene Wirkungen in vivo untersucht worden. In den meisten Fällen wurde das Blut von Frauen zytogenetisch analysiert, die orale Kontrazeptiva einnahmen. Entsprechende Analysen wurden an Neugeborenen durchgeführt und an induziert oder spontan abortierten Feten, deren Mütter vor der Schwangerschaft OC eingenommen hatten.

Die Untersuchungen bis 1975 wurden von BISHUN (1976) in einem Übersichtsartikel einer kritischen Bewertung unterzogen.

Die Arbeiten zur Abklärung des mutagenen Risikos durch künstliche Sexualsteroidoide sind in den Tabellen 4 - 4h aufgelistet: (a) Genmutationen durch Sexualsteroidderivate konnten nicht nachgewiesen werden (b) Alle anderen Tests sind in der Mehrzahl ebenfalls negativ. Positive Resultate wurden von bestimmten Steroidderivaten berichtet, wie etwa Norethisteronazetat. Mehrere Untersuchungen geben Anlaß zu der Vermutung, daß einige Substanzen möglicherweise numerische Chromosomenaberrationen induzieren könnten. Einige der Analysen auf strukturelle Aberrationen mit schwach positiven Resultaten müssen hinsichtlich ihrer Interpretation in Frage gestellt werden. Die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen durch einige spezifische Derivate kann nicht ausgeschlossen werden (c) Bei Frauen, die hormonale Kontrazeptiva verwenden, ist die SCE-Rate erhöht. Es existieren jedoch widersprüchliche Auffassungen, ob die Hormone oder ein höherer Zigarettenkonsum in dieser Untersuchungsgruppe zu erhöhten SCE-Raten führen.

## 1b.6. Erläuterungen zu den Literaturtabellen

Die Wiedergabe von differenzierten Beurteilungen der Ergebnisse, wie sie in einigen Arbeiten vorgenommen wurde, ist in den Tabellen nicht möglich. Eine Klassifizierung wurde nach positiven (mit + gekennzeichnet), nach schwach positiven (mit (+) gekennzeichnet) und nach negativen (mit - gekennzeichnet) Ergebnissen vorgenommen. In den Tabellen sind grundsätzlich die Auffassungen der Autoren angegeben. Wenn der Verfasser dieser Arbeit das angegebene Ergebnis anders beurteilt, so ist dies mit einem ? gekennzeichnet.

### Liste der in den Literaturtabellen verwendeten Abkürzungen:

|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| HL               | : Humanlymphozyten                   |
| Meiot. n.- d.    | : meiotisches non-disjunction        |
| Mitot. c.- o.    | : mitotisches crossing-over          |
| Mitot. n.- d.    | : mitotisches non-disjunction        |
| MMC              | : Mitomycin C                        |
| n.a.             | : nicht angegeben                    |
| n.b.             | : nicht bekannt                      |
| rep <sup>+</sup> | : "repair proficient"                |
| rep <sup>-</sup> | : "repair deficient"                 |
| RER              | : Rauhes Endoplasmatisches Retikulum |
| UV               | : Ultraviolette Strahlung            |

### für genetische Marker

Resistenz gegen:

|                    |                                             |                   |                     |
|--------------------|---------------------------------------------|-------------------|---------------------|
| AA <sup>r</sup>    | : 8-Azaadenin (8)                           | aza <sup>r</sup>  | : Azaguanin         |
| Car <sup>r</sup>   | : Carboxin                                  | FuDR <sup>r</sup> | : Fluordesoxyuridin |
| Oua <sup>r</sup>   | : Ouabain                                   | Tg <sup>r</sup>   | : Thioguanin        |
| TK <sup>+</sup> /- | : Genlocus für Thymidinkinase (heterozygot) |                   |                     |

### für Testsysteme

|            |                                           |
|------------|-------------------------------------------|
| DCB-Test   | : DNA-covalent binding Test               |
| DLT        | : Dominant Letal Test                     |
| MLV-Test   | : Mouse leukemia virus integration test   |
| MNT        | : Mikrokerntest                           |
| SLRL-Test: | Geschlechtsgebundener Rezessiv Letal-Test |
| UDS        | : Unscheduled DNA Synthesis               |

für Bakterien und Fungi

Aspergillus nid. : Aspergillus nidulans  
Bac. subtilis : Bacillus subtilis  
Cladosporium cuc. : Cladosporium cucumerinum  
E. coli : Escherichia coli  
Fusarium oxysp. : Fusarium oxysporum  
Neurosp. crassa : Neurospora crassa  
Sacch. cerev. : Saccharomyces cerevisiae  
S. typh. : Salmonella typhimurium

für Verabreichungsformen in in vivo-Tests

i.a.: intraarteriell                      i.g.: intragastral  
i.m.: intramuskulär                    i.p.: intraperitoneal  
i.v.: intravenös                        p.o.: per os  
s.c.: subcutan

für Zelllinien

AH 66-B : Ratte (stoffwechselaktiv)  
BALB/C3T3 : Leukämische Tumorzellen der Maus  
BHK : "baby hamster kidney"  
CHANG : Menschliche Leberzellen  
CHL : "chinese hamster lung"  
CHO : "chinese hamster ovary"  
C3H(2K) : Nierenzellen der Maus  
CHT : "chinese hamster thymus"  
DL : Rattenleberzellen  
DON (DON 6) : "chinese hamster lung"  
EDEN 1/TC : Leukämiezellen der Ratte  
HAK : "syrian hamster kidney"  
HEL 299 : "human embryo lung"  
HMA : Maus Aszites Tumorzellen  
HSBP : primäre Humanfibroblasten  
HTC : "hepatic tumor cells rat"  
L : Maus Bindegewebe  
L5178 : Maus Lymphomazelllinie  
KB-C : Carzinoma Zelllinie  
R1 : Rattenzelllinie (stoffwechselaktiv)  
REW 8 : Mensch-Maus Hybridzellen  
RL<sub>4</sub> : Rattenleberzelllinie  
RLV/RE : embryonale Rattenzellen  
SHE : "syrian hamster embryo"  
V 79 : Chinesische-Hamster Zelllinie

TABELLE 1:

Untersuchungen mit MBC und BEN an Bakterien, Fungi und Gefäßpflanzen

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz               | Testsystem                            | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                 |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| <u>Untersuchungen an Bakterien</u>               |                                       |                                                                      |                                                              |                                   |                           |
| MBC u.<br>BEN                                    | S. typh.<br>ohne Aktivierung          | 0,1 mg/Platte                                                        | Basenpaarsubst.<br>Vorwärtsmut.                              | +                                 | SEILER, 1972              |
| BEN                                              | E. coli, S. typh.<br>ohne Aktivierung | 0,125 - 15 µg/ml                                                     | Germutat. rep <sup>-</sup><br>Germutat. rep <sup>+</sup>     | +                                 | KAPPAS et al., 1976       |
| BEN                                              | E. coli, S. typh.<br>+/- S9-Mix       | bis 5 mg/Platte                                                      | Germutationen                                                | -                                 | MORIYA et al., 1983       |
| <u>Untersuchungen an Fungi und Gefäßpflanzen</u> |                                       |                                                                      |                                                              |                                   |                           |
| BEN                                              | Aspergillus nid.                      | 0,2 - 0,45 µg/ml<br>und 500µg/Platte                                 | Germutat. aza <sup>r</sup><br>Mitot. c.- o.<br>Mitot. n.- d. | -<br>-<br>+                       | BIGNAMI et al., 1977      |
| BEN                                              | Allium cepa<br>Secale cereale         | 600-1200 ppm                                                         | Mitoseindex<br>Aberr. Mitosen<br>Aberr. Meiosen              | -<br>+<br>-                       | BOYLE, 1973               |
| MBC                                              | Fusarium oxysp.                       | 5 µg/ml                                                              | Vorwärtsmutat.                                               | +                                 | DASSENJOY und MEYER, 1973 |
| BEN                                              | Allium cepa                           | 50 u. 100µg/ml                                                       | Chromos. Aberr.                                              | -                                 | DASSENJOY und MEYER, 1973 |
| MBC                                              | Aspergillus nid.                      | 4 x 10 <sup>-6</sup> M                                               | Aberr. Zellteil.<br>Verdoppl.DNA-Geh.                        | +                                 | DAVIDSE, 1973, 1975       |

TABELLE 1a:

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz                               | Testsystem                                   | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                                                                                | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                                                               |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| <u>Untersuchungen mit MBC und BEN an Fungi und Gefäßpflanzen</u> |                                              |                                                                      |                                                                                                                              |                                   |                                                                         |
| BEN                                                              | Sacch. cerev.<br>Aspergillus nid.            | 400 - 3200ppm                                                        | Genkonversion                                                                                                                | -                                 | DE BERTOLDI et al.,<br>1980                                             |
| BEN                                                              | Aspergillus nid.                             | 1,5 mM/Platte                                                        | Gemutat.<br>Mitot. n.- d.                                                                                                    | -<br>+                            | GUALANDI und BELLINCAMPI,<br>1981                                       |
| BEN                                                              | Aspergillus nid.                             | n.b.                                                                 | Gemutat. rep <sup>+</sup>                                                                                                    | -                                 | HASTIE, 1970                                                            |
| MBC u.<br>BEN                                                    | Aspergillus nid.                             | 0,5 - 2,5 x10 <sup>-6</sup> M<br>und<br>0,25 - 0,4 µg/ml             | Mitot. n.- d.<br>Mitot. c.- o.<br>Somat. Rekomb.<br>Brüche u. Del.<br>Gemutat. rep <sup>+</sup><br>Gemutat. rep <sup>-</sup> | +<br>-<br>+<br>-<br>-<br>+        | KAPPAS, 1978, 1981;<br>KAPPAS und BRIDGES, 1981;<br>KAPPAS et al., 1974 |
| MBC u.<br>BEN                                                    | Botrytis cinerea<br>u. Allium cepa           | 100 µg/ml                                                            | Aberr. Zellteil.<br>Chromos. Aberr.                                                                                          | +<br>(+)                          | RICHMOND und PHILLIPS,<br>1975; RICHMOND und PRING,<br>1977             |
| BEN                                                              | Sacch. cerev.                                | n.b.                                                                 | Genkonversion                                                                                                                | -                                 | SIEBERT et al., 1970                                                    |
| MBC                                                              | Aspergillus nid.<br>und<br>Cladosporium cuc. | 2,8 µM<br>0,6 µM                                                     | Gemutat. Car <sup>r</sup><br>Gemutat. MBC <sup>r</sup><br>Gemutat. Car <sup>r</sup><br>Gemutat. MBC <sup>r</sup>             | -<br>-<br>+<br>+<br>-             | SPEAKMAN und NIRENBERG,<br>1981                                         |

TABELLE 1b:

Untersuchungen mit MBC und BEN (in vivo-Tests)

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz | Testsystem                                                             | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                      | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                      |
|------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| MBC                                | Fellflecktentest<br>an der Maus                                        | 100-300 mg/kg<br>p.o.                                                | Genetisch rele-<br>vante Flecken                                   | +                                 | FAHRIG und SEILER, 1979        |
| BEN                                | Spermienmorpho-<br>logie Maus                                          | 250-1000 mg/kg<br>i.p.                                               | % abn. Spermien                                                    | -                                 | OSTERLOH et al., 1983          |
| BEN                                | Zytoget. Studien<br>Ratten                                             | 200 mg p.o.                                                          | Chromosom. Aberr.:<br>Feten<br>Knochenmark<br>Lymphozyten          | +                                 | RUZICKA et al., 1975           |
| MBC u.<br>BEN                      | Zytoget. Studien<br>Mensch (Arbeiter in der<br>Produktion von Benomyl) |                                                                      |                                                                    | -                                 |                                |
|                                    | MNT- Knochenmark<br>Maus                                               | 50 - 1000 mg/kg<br>p.o. und i.p.                                     | Mikrokerne p.o.<br>i.p.                                            | +                                 | SEILER, 1976                   |
|                                    | Knochenmark, chin.<br>Hamster <u>in vivo</u>                           |                                                                      | Mitosearret.<br>Mikrokerne<br>Aberr. Anaphasen<br>Struktur. Aberr. | +                                 | SEILER, 1976, 1977             |
| BEN                                | DLT, Ratte                                                             | bis 0,50% p.o.                                                       | Prä-postimplant.<br>Verlust                                        | -                                 | SHERMAN et al., 1975           |
| BEN                                | DLT, Ratte                                                             | 280 mg/kg p.o.                                                       |                                                                    | -                                 | RIDEG und IMRE, 1982           |
| MBC                                | Knochenmark,<br>Ratte <u>in vivo</u>                                   | 1 g/kg p.o.<br>und i.p.                                              | Mitot. Arretierung<br>Abnorme Mitosen                              | +                                 | STYLES und GARNER, 1974        |
| MBC                                | MNT- Knochenmark<br>Maus                                               | 100- 500 mg/kg                                                       | Chromos. Aberr.<br>Mikrokerne                                      | -                                 | TSUCHIMOTO und MATTER,<br>1977 |

TABELLE 1c:

MBC und BEN in zytogenetischen Tests mit Säugerzellen in vitro

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz | Testsystem                                                  | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                                 | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                      |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| MBC u.<br>BEN                      | embryon. Epithel-<br>zellen Maus (C3H)                      | 1-100 µg/ml                                                          | Multiple Mikro-<br>kerne                                                      | +                                 | DE BRABANDER et al.,<br>1976 a |
| MBC                                | Zelllinien <u>in vitro</u><br>(CHANG, HeLa, L,<br>HAK, DON) | bis $1 \times 10^{-2}$ M                                             | Metaphasearret.<br>Abnorme Mikrokerne<br>Anaphasebrücken<br>Chromosomenbrüche | +<br>+<br>+<br>(+)                | STYLES und GARNER 1974         |

TABELLE 1d:

MEC-verwandte Substanzen in Mutagenitätstests und zytogenetischen Studien

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz | Testsystem                                                | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie | ange-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                        |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| NSC 238 159                        | embryon. Epithel-<br>zellen Maus (C3H)<br><u>in vitro</u> | 0,01 - 10 µg/ml                                                      | Mitosearretierung             | +                               | DE BRABANDER et al.,<br>1976 b   |
| Benzimidazol                       | Humanlympho-<br>zyten <u>in vitro</u>                     | 1 - 100 µg/ml                                                        | Mitoseindex                   | -                               | HOLDEN et al., 1980              |
| Oxfendazol                         |                                                           |                                                                      |                               | -                               |                                  |
| Thiabendazol                       |                                                           |                                                                      |                               | -                               |                                  |
| Fenbendazol                        |                                                           |                                                                      |                               | +                               |                                  |
| Camendazol                         |                                                           |                                                                      |                               | +                               |                                  |
| Mebendazol                         |                                                           |                                                                      |                               | +                               |                                  |
| Parbendazol                        |                                                           |                                                                      |                               | +                               |                                  |
| NSC 181 928                        | Zellkulturen<br><u>in vitro</u>                           | 5 x 10 <sup>-9</sup> bis<br>5 x 10 <sup>-7</sup> M                   | Mitosearretierung             | +                               | WHEELER et al., 1982             |
|                                    | Aszitestumor-<br>zellen (HMA)                             | 67 - 150 mg/kg<br>i.p.                                               | Mitosearretierung             | +                               |                                  |
| Mebendazol                         | Salmonella typh./<br>Mikrosomen Test                      | 0,15 - 150µg/<br>Platte                                              | Punktmutationen               | -                               | CORTINAS DE NAVA<br>et al., 1983 |
| Mebendazol                         | DLT-Maus                                                  | 160-640mg/kg p.o.                                                    | Dominant Letale               | -                               | LEONARD et al., 1974             |
| Methylthio-<br>phanat              | DLT-Maus                                                  | 8-500mg/kg i.p.                                                      | Dominant Letale               | -                               | MAKITA et al., 1973              |
| verschiedene<br>Alkylcarbamate     | SCE-Test Maus<br><u>in vivo</u>                           | 0,55 - 8,8 mmol/<br>kg i.p.                                          | Erhöhte SCE-Raten             | +                               | CHENG et al., 1981               |

TABELLE 2:

Untersuchungen mit DES (Kurzzeittests mit unterschiedlichen Endpunkten)

| Testsystem                                                                       | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | Endpunkte in der Studie                           | angegebenes Ergebnis | Literatur                                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------|
| DNA-Fraktionierung in Säugerzellen                                               | 0,03-3 mM                                               | Fraktionierte DNA                                 | +                    | MELTZ et al., 1979; SINA et al., 1983                        |
| DNA-Bindung <u>in vitro</u> (Zellen von Maus u. Ratte) u. <u>in vivo</u> (Ratte) | 16,7 $\mu$ M<br>bis 6,9 mg/kg                           | Kovalente Bindung an DNA                          | +                    | BLACKBURN et al., 1974; LUTZ et al., 1982; TS'O und LU, 1964 |
| Proteinbindung <u>in vitro</u>                                                   | $3 \times 10^{-8}$ M                                    | Bindung an Protein (HEL 299-Zellen)               | +                    | MURAKAMI und FUKAMI, 1983                                    |
| Degranulations-test (Rattenleberzellen)                                          | 50 $\mu$ g/ml                                           | Degranulation des RER                             | +                    | (FEY et al.,) in DE SERRES und ASHBY, 1981                   |
| Zellkernvergrößerung                                                             | bis 100 $\mu$ g/ml                                      | Vergrößerung des Zellkerns: (HeLa) (Fibroblasten) | +                    | (AGRELO und AMOS,) in DE SERRES und ASHBY, 1981              |
| MLV-Test <u>in vitro</u>                                                         | 1 - 100 $\mu$ g/Platte                                  | Virus Integration (C3H2K - Zellen)                | +                    | (YOSHIKURA und MATSUSHIMA,) in DE SERRES und ASHBY, 1981     |

TABELLE 2a:

Untersuchungen mit DES (Transformationstests und DNA-Reparatur)

| Testsystem                                                                     | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | Endpunkte in der Studie                                                      | angegebenes Ergebnis | Literatur                                                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zelltransformationstests<br><u>in vitro</u> , teilweise mit metab. Aktivierung | bis 10 µg/ml                                            | Morphologische Transformation von Säugerzellen (SHE; RLV/RE BALB/C 3T3; BHK) | +                    | BARRETT et al., 1981; (DANIEL und DEHNEL) in DE SERRES und ASHBY, 1981; DUNKEL et al., 1981; MC LACHLAN et al., 1982; PIENITA, 1980     |
| Zelltransformation +/- S9-Mix                                                  | 0,3 - 30 µg/ml                                          | Transformation (BHK 21)                                                      | -                    | (STYLES) in DE SERRES und ASHBY, 1981                                                                                                   |
| DNA-Reparatur <u>in vitro</u> , teilweise mit metab. Aktivierung               | bis 100 µg/ml                                           | DNA-Reparatursynthese (HeLa; Humanfibroblasten; prim. Rattenhepatozyten)     | -                    | (AGRELO und AMOS, MARTIN und MC DERMID, ROBINSON und MITCHELL) in DE SERRES und ASHBY, 1981; PROBST et al., 1981; WILLIAMS et al., 1982 |
| DNA-Reparatur +/- S9-Mix                                                       | $1 \times 10^{-6}$ M                                    | UDS (HeLa)                                                                   | +                    | MARTIN et al., 1978                                                                                                                     |
| DNA-Reparatur-Inhibition                                                       | $1,3 \times 10^{-5}$ M                                  | UV-induzierte Reparatur vermindert (Humanlymphozyten)                        | +                    | GAUDIN et al., 1971, 1974                                                                                                               |

TABELLE 2b:

Untersuchungen mit DES (Bakterientests)

| Testsystem                                              | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | Endpunkte in der Studie | angegebenes Ergebnis | Literatur                                                                                                                                                       |
|---------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Salmonella typh.</i><br>-/+ Aktivierung              | bis 3 mg/Platte                                         | Genmutationen           | -                    | ANDERSON und STYLES, 1978; BARTSCH et al., 1980; CONNOR et al., 1979; GLATT et al., 1979; INGEROWSKI et al., 1981; LANG und REDMANN, 1979; MC CANN et al., 1975 |
| <i>S. typh./Mikrosomen</i><br>und <i>E. coli</i> Tests, | (Zusammenfassung von 20 Tests)                          | Genmutationen           | -                    | (BRIDGES et al.,) in DE SERRES und ASHBY, 1981                                                                                                                  |
| <i>Escherichia coli</i>                                 | "gesättigte Lsg."                                       | Genmutationen           | -                    | HEMMERLY und DEMEREC, 1955                                                                                                                                      |
| <i>E. coli</i> Tests<br>-/+ S9-Mix                      | bis 2,5 mg/ml                                           | DNA-Schädigung          | -                    | MANBER et al., 1983; (GREEN, ICHINO-TSUBO et al., TWEATS, ROSENKRANZ et al., DAMELY et al., THOMSON) in DE SERRES und ASHBY, 1981                               |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                | bis 2 mg/Platte                                         | DNA Reparatur           | -                    | (KADA) in DE SERRES und ASHBY, 1981                                                                                                                             |

TABELLE 2c:

Untersuchungen mit DES, (DES-diphosphat und DES-dipropionat); (Genetische Tests an Fungi)

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz | Testsystem                                 | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                                | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                                           |
|------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|
| DES-<br>diphos.                    | Neurosp. crassa                            | n.a.                                                                 | Meiot. n.-d.                                                                 | -                                 | GRIFFITHS, 1979                                     |
| DES                                | Sacch. cerev.                              | bis 2000µg/ml                                                        | Genmutationen<br>Rekombination<br>Genkonversion                              | (+)<br>+<br>+                     | MEHTA und VON BORSTEL, 1980,<br>1982                |
| DES-<br>diprop.<br>DES             | Sacch. cerev.                              | bis 500µg/ml                                                         | Mitot. n.-d.                                                                 | +                                 | PARRY, 1977                                         |
|                                    | Sacch. cerev.                              | 10 - 200µg/ml                                                        | Mitot. n.-d.                                                                 | +                                 | PARRY et al., 1981                                  |
| DES                                | Sacch. cerev.<br>und Schizosacch.<br>pombe | (Zusammenfassung<br>von 8 Testergeb-<br>nissen)                      | Vorwärtsmit.<br>Reversion<br>Mitot. Rekomb.<br>Genkonversion<br>Mitot. n.-d. | -<br>-/(+)<br>-<br>-<br>-         | (DE SERRES et al.,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981 |
| DES                                | Sacch. cerev.                              | 10 <sup>-6</sup> - 10 <sup>-5</sup> M                                | Mitot. n.-d.                                                                 | +                                 | (PARRY und SHARP,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981  |

TABELLE 2d:

Untersuchungen mit DES (Punktmutationstests mit Säugerzellen in vitro)

| Testsystem<br>und<br>Zelllinien                      | angegebene Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | angegebene End-<br>punkte in der<br>Studie (gene-<br>tischer Marker)     | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                                            |
|------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------|
| Hamsterzellen<br>(V 79, SHE)                         | 0,01 - 10 µg/ml                                                     | 8 aza <sup>r</sup> , Oua <sup>r</sup> , Tg <sup>r</sup>                  | -                                 | BARRETT et al., 1981, 1983                           |
| V 79 mit Akti-<br>vierung durch<br>prim. Hepatozyten | 25 - 100 µM                                                         | 8 aza <sup>r</sup> , Oua <sup>r</sup>                                    | -                                 | DREYON et al., 1981                                  |
| Maus-Lymphoma<br>Test (L5178)                        | 1 - 300 µg/ml                                                       | TK <sup>+</sup> /-                                                       | +                                 | CLIVE et al., 1983; MELTZ et al.,<br>1979            |
| Maus-Lymphoma<br>Test (L5178)<br>+/- S9-Mix          | 7,5 - 500 µg/ml                                                     | TK <sup>+</sup> /-                                                       | -                                 | (JOTZ und MITCHELL,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981 |
| Hamsterzellen<br>(CHO) +/- S9-Mix                    | 7,5 - 40 µg/ml                                                      | AA <sup>r</sup> , Tg <sup>r</sup> , Oua <sup>r</sup> , FUDR <sup>r</sup> | -                                 | (CARVER et al.,) in DE SERRES und<br>ASHBY, 1981     |

TABELLE 2e:

Untersuchungen mit DES (und DES-diphosphat); (in vivo-Studien an *Drosophila* und Säugern)

| im Test<br>einge-<br>setzte<br>Substanz | Testsystem                     | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie      | angege-<br>benes-<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                                                                                                                   |
|-----------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DES                                     | SLRL-Test<br><i>Drosophila</i> | 1000 ppm                                                             | Rezess. Letale                     | -                                  | HENKE et al., 1958; (VALENCIA<br>und HOUTCHENS,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981                                            |
| DES                                     | Spermienmor-<br>phologie Maus  | 25 - 500 mg/kg<br>70 - 1125 mg/kg                                    | % abn. Spermien<br>% abn. Spermien | +<br>-                             | TOPHAM, 1979; und (TOPHAM,) in<br>DE SERRES und ASHBY, 1981<br>(WYROBEK et al.,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981            |
| DES-<br>diphos.                         | DLT-Maus                       | 100 µg/Tier i.p.                                                     | Dominant Letale                    | -                                  | BECKER und SCHÖNEICH, 1981                                                                                                  |
| DES-<br>diphos.<br>DES                  | MNT-Maus<br>MNT-Maus           | 0,01 - 500 mg/kg<br>i.p.<br>bis 280 mg/kg<br>i.p.                    | Mikrokerne<br>Mikrokerne           | -<br>-                             | CHRISMAN und BAUMGARTNER, 1979<br>MOLINA et al., 1978; (KIRKHART,<br>TSUCHIMOTO und MATTER) in<br>DE SERRES und ASHBY, 1981 |
| DES                                     | MNT-Maus                       | bis 400 mg/kg<br>i.p.                                                | Mikrokerne                         | (+)                                | (SALAMONE et al.,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981                                                                          |

TABELLE 2f:

Untersuchungen mit DES (und DES-diphosphat); (Zygotenetische Studien in vivo)

| im Test<br>eingesetzte<br>Substanz | Testsystem                          | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie      | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                                       |
|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| DES                                | Knochenmark Ratte                   | 15 - 90 mg/Tier                                                      | Chronos.Aberr.                     | -                                 | BISHUN et al., 1977 a                           |
| DES-<br>diphos.                    | Knochenmark Maus<br>Mäuseembryos    | bis 100µg/g i.p.<br>bis 1µg/(Tier?)                                  | Hypo- und Hyper-<br>ploidie        | +                                 | CHRISMAN, 1974                                  |
| DES-<br>diphos.                    | Knochenmark Maus                    | 25-200mg/kg i.v.                                                     | Chronos.Aberr.<br>SCE              | +                                 | CHRISMAN und HINKLE, 1974                       |
|                                    |                                     |                                                                      | Hyperploide in<br>2. zu 1. Mitosen | -                                 | IVETT und TICE, 1981                            |
| DES                                | Knochenmark Ratte                   | n.a.                                                                 | Chronos. Aberr.                    | -                                 | KAWACHI et al., 1980                            |
| DES                                | Knochenmark und<br>Leberzellen Maus | 0,14 - 308 µg/g                                                      | SCE                                | -/+                               | (PAIKA et al.,) in DE SERRES<br>und ASHBY, 1981 |

TABELLE 2g:

Untersuchungen mit DES (Zytenetische Studien an Säugerzellen in vitro)

| Testsystem und Zelllinien                          | angegebene Konzentrationen                             | angegebene Endpunkte in der Studie               | angegebenes Ergebnis | Literatur                                                                                                     |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Zellkulturen mit HL; KB-C; DON; CHL                | $10^{-6} - 10^{-3}$ M                                  | Chromos. Aberr. und SCE                          | -                    | ABE und SASAKI, 1977                                                                                          |
| Zellkulturen mit DON-6; AH 66-B; R1                | $10^{-7} - 10^{-5}$ M                                  | SCE<br>(metab.aktiv) AH 66-B<br>(metab.aktiv) R1 | -<br>(+)<br>(+)      | ABE und SASAKI, 1982 a                                                                                        |
| KB-Karzinoma und Humanlymphozyten                  | 5 - 20 µg/ml                                           | Chromos. Aberr.                                  | -                    | BISHUN et al., 1977 a                                                                                         |
| Humanlymphozyten                                   | 1 - $4 \times 10^{-5}$ M                               | SCE<br>Polyploidien                              | (+)<br>(+)           | HILL und WOLFF, 1982, 1983                                                                                    |
| Hamsterzellen (CHL)                                | 15µg/ml $\triangleq 6 \times 10^{-5}$ M                | Chromos. Aberr.<br>Polyploidien                  | -<br>+               | ISHIDATE und ODASHIMA, 1977                                                                                   |
| Primäre Hautfibroblasten Mensch (metab. aktiv)     | $1 \times 10^{-8} - 2 \times 10^{-6}$ M                | SCE                                              | (+)                  | RÜDIGER et al., 1979                                                                                          |
| CHO +/- S9-Mix                                     | bis 100 µg/ml<br>bis 1,67 mg/ml<br>0,83 und 1,67 mg/ml | SCE<br>SCE<br>Chromos. Aberr.                    | -<br>-<br>+          | (EVANS und MITCHELL, NATARAJAN und VAN KESTEREN VAN LEEUWEN, PERRY und THOMPSON) in DE SERRES und ASHBY, 1981 |
| Rattenleberzellen (RL <sub>1</sub> , metab. aktiv) | 5 - 20 µg/ml                                           | Chromos. Aberr.                                  | -                    | (DEAN,) in DE SERRES und ASHBY, 1981                                                                          |

TABELLE 2h:

Untersuchungen mit DES (und DES-dipropionat), (zytologische Studien zur Zellteilung)

| im Test<br>einge-<br>setzte<br>Substanz | Testsystem                                                  | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                          | angege-<br>benes-<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                 |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| DES                                     | Seeigeleier                                                 | 0,5 µg/ml                                                            | Mitosearretierung                                                      | +                                  | DRUCKREY, 1952            |
| DES                                     | Fibroblasten vom<br>Hamster (Lunge)                         | n. a.                                                                | Tetraploide Zellen<br>Chromos.Aberr.u.SCE                              | +                                  | KAWACHI et al., 1980      |
| DES                                     | HeLa-Zellen                                                 | $2,5 \times 10^{-5}$ M                                               | Mitotisches n.-d.                                                      | +                                  | RAO und ENGELBERG, 1967   |
| DES                                     | Zellkulturen mit<br>CFT; DL; EDEN 1/TC<br>und HeLa S3       | 7,5 - 15 µg/ml                                                       | C-Metaphasen, multi-<br>ple Kerne, aneuploide<br>und polyploide Zellen | +                                  | SAWADA und ISHIDATE, 1978 |
| DES-<br>diprop.                         | Humanlymphozyten<br>RL <sub>4</sub> und REW 8               | bis 25 µg/ml                                                         | Aneu- Polyploidie,<br>abnorme Ana- und                                 | +                                  | DANFORD et al., 1982      |
|                                         | primäre Humanfibro-<br>blasten (HSBP)                       | 5 - 25 µg/ml                                                         | Telophasen, erhöhter<br>Mitoseindex                                    | +                                  | DANFORD und PARRY, 1982   |
|                                         | HSBP (kombinierte<br>Spindel- und Chro-<br>mosomenanfärbung | 5 - 20 µg/ml                                                         |                                                                        | +                                  | PARRY et al., 1983        |

TABELLE 3:

Untersuchungen mit natürlich vorkommenden Sexualsteroiden (Kurzzeittests mit verschiedenen Endpunkten)

| Testsystem                                  | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | Endpunkte in der Studie              | im Test eingesetzte Substanzen | angewendete Ergebnisse | Literatur                 |
|---------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------|---------------------------|
| Transformations-tests BALB/C3T3             | 0,08 - 10 µg/ml                                         | Zelltransformation                   | Progesteron                    | -                      | DUNKEL et al., 1981       |
| SHE-clonal                                  | 0,05 - 50 µg/ml                                         |                                      | Progesteron                    | -                      |                           |
| RLN/RE                                      | 0,71 - 2,6 µg/ml                                        |                                      | Progesteron                    | +                      |                           |
| SHE +/- S9-Mix                              | bis 50 µg/ml                                            |                                      | Progesteron                    | -                      | PIENTA, 1980              |
| DNA-Reparaturinhibition in Humanlymphozyten | $10^{-6}$ - $10^{-5}$ M                                 | Inhibition DNA-Reparatur-Replikation | Estradiol                      | +                      | GAUDIN et al., 1971, 1974 |
|                                             |                                                         |                                      | Progesteron                    | +                      |                           |
|                                             |                                                         |                                      | Testosteron                    | +                      |                           |
| DNA-Synthese in Humanlymphozyten            | 1 - 100 µM                                              | Inhibition DNA-Synthese              | Progesteron                    | +                      | CLEAVER und PAINTER, 1975 |
| primäre Humanfibroblasten                   | 36,7 µM                                                 | DNA-Reparatur                        | Estradiol                      | -                      | HART et al., 1977         |
| DNA-Fraktionierung, zellfrei                | $10^{-5}$ - $10^{-4}$ M                                 | Fraktionierung von Einzelstrang-DNA  | Estradiol                      | +                      | YAMAFUJI et al., 1971     |
|                                             |                                                         |                                      | Testosteron                    | +                      |                           |
| DNA-Bindung, zellfrei +/- S9-Mix            | bis $10^{-2}$ M                                         | Bindung an DNA                       | Estradiol                      | +                      | BLACKBURN et al., 1974    |
|                                             |                                                         |                                      | Estron                         | +                      |                           |
| Ratte <u>in vivo</u>                        | 80 µg/Tier p.o.                                         | Bindung an DNA                       | Estron                         | (+)                    | JAGGI et al., 1978        |
| zellfrei                                    | n.b.                                                    | Bindung an DNA                       | Estradiol                      | +                      | TS'O und LU, 1964         |
|                                             |                                                         |                                      | Testosteron                    | +                      |                           |

TABELLE 3a:

Untersuchungen mit natürlich vorkommenden Sexualsteroiden (Proteinbindung und Mutagenitätstests ohne zytogenetische Untersuchungen)

| Testsystem                                        | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | Endpunkte in der Studie                                  | im Test eingesetzte Substanzen          | angegebene Ergebnisse | angegebene Literatur                          |
|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------|
| Proteinbindung<br>HEL 299-Zellen                  | $3 \times 10^{-8}$ M                                    | Bindung an Proteine                                      | Estradiol<br>Progesteron<br>Testosteron | +<br>(+)<br>(+)       | MURAKAMI und FUKAMI, 1983                     |
| zellfrei                                          | n.b.                                                    | Bdg. an Proteine des Zellkerns                           | Estradiol                               | +                     | HASELBACHER und EISENFELD, 1976               |
| Salmonella typh./<br>Mikrosomen Test              | 500 µg/Platte                                           | Punktmutationen                                          | Estradiol<br>Testosteron                | -<br>-                | INGEROWSKI et al., 1981                       |
| Chines.Hamster<br>V79 mit zellvermittelter Aktiv. | bis 2,5 mg/Platte<br>25 - 100µM                         | Punktmutationen<br>8 aza <sup>r</sup> , Oua <sup>r</sup> | Estradiol<br>Estradiol<br>Estron        | -<br>-<br>-           | LANG und REDMANN, 1979<br>DREVON et al., 1981 |
| DLT-Maus                                          | 33-167 mg/kg i.p.                                       | Dominant Letale                                          | Progesteron                             | -                     | EPSTEIN et al., 1972                          |

TABELLE 3b:

Untersuchungen mit natürlich vorkommenden Sexualsteroiden (Zytologische Studien in vivo und in vitro)

| Testsystem<br>oder unter-<br>suchte<br>Zellen                | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                 | im Test<br>eingesetzte<br>Substanzen         | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur             |
|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|
| CHL-Fibroblasten<br>(MMC- und UV- in-<br>duzierte SCE)       | $1 \times 10^{-5}$ M                                                 | SCE-Erhöhung durch<br>Steroide                | Estradiol<br>Progesteron<br>Testosteron      | -<br>+<br>+                       | BYNUM et al., 1980    |
| HTC- Zellen Ratte                                            | 1 - 20 $\mu$ M                                                       | Reduktion der CP-<br>induzierten SCE-Rate     | Estradiol                                    | +                                 | DEAN et al., 1980     |
| Humanlymphozyten                                             | $10^{-6}$ - $10^{-4}$ M                                              | SCE<br>Polyploidie                            | Estradiol und<br>Estrinol                    | -<br>-                            | HILL und WOLFF, 1983  |
| primäre embryon.<br>Nierenzellen Mensch                      | 0,1 $\mu$ g/ml                                                       | Chronos. Aberr. und<br>Aneuploidie            | Progesteron<br>Testosteron                   | + ?<br>+ ?                        | KANG et al., 1968     |
| Hamsterfibrobl.<br>Humanfibrobl.                             | n.a.<br>n.a.                                                         | Chronos. Aberr.<br>Chronos. Aberr.<br>und SCE | Progesteron<br>Progesteron                   | -<br>-                            | KAWACHI et al., 1980  |
| Synovialzellen<br>Mensch                                     | $2,5 \times 10^{-9}$ M bis<br>$2,5 \times 10^{-5}$ M                 | Hyperploidie                                  | Estradiol<br>Testosteron                     | (+)<br>-                          | LYCETTE et al., 1970  |
| Zervixepithel-<br>zellen Mensch                              | $2,5 \times 10^{-7}$ M<br>(6,8 $\mu$ g/ml)                           | Aneuploidie                                   | Estradiol                                    | -                                 | LYCETTE et al., 1973  |
| CHL +/- S9-Mix                                               | bis 1,5 mM                                                           | Chronos. Aberr.                               | Progesteron                                  | -                                 | MATSUOKA et al., 1979 |
| Schweineoocyten<br><u>in vitro</u> , mei-<br>otische Reifung | 1 - 10 $\mu$ g/ml                                                    | Numerische Aberr.                             | Estradiol<br>Progesteron<br>Estrad. u. Prog. | +<br>+<br>-                       | MC GAUGHEY, 1977      |

TABELLE 3c:

| Testsystem<br>oder unter-<br>suchte<br>Zellen                    | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                                               | im Test<br>eingesetzte<br>Substanzen                                        | ange-<br>benes-<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                                      |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------|
| <u>Untersuchungen mit natürlich vorkommenden Sexualsteroiden</u> |                                                                      |                                                                                             |                                                                             |                                  |                                                |
| CHI-Fibroblasten                                                 | n.a.                                                                 | Chronos. Aberr.                                                                             | "7 Steroidhormone"                                                          | -                                | MOGI und WATANABE, 1982                        |
| Pisum sativum<br>Wurzelmeristem                                  | gesättigte<br>wässrige Lsg.                                          | Numer. und strukt.<br>Aberrationen in<br>Wurzeltumoren                                      | Progesteron<br>Testosteron                                                  | + ?<br>-                         | PRASAD und HAIDER, 1982                        |
| HeLa-Zellen                                                      | $2,5 \times 10^{-5}$ bis<br>$1,0 \times 10^{-4}$ M                   | mitotisches n.- d.<br><br>Spindelstörungen,<br>mitot. Arrest., Aneu-<br>ploidie, Mikrokerne | Estradiol, Estriol +<br>Estron, Progesteron<br>und Testosteron<br>Estradiol | +<br>-<br>+                      | RAO und ENGELBERG, 1967                        |
| embryon. Fibroblas-<br>ten und Nierenepi-<br>thelzellen, Mensch  | 0,1 - 10 µg/ml                                                       | Struktur. Aberr.                                                                            | Estradiol<br>Progesteron<br>Testosteron                                     | (+)<br>(+)<br>(+)                | SEROVA und KERKIS, 1974                        |
| Humanlymphozyten<br><u>in vitro</u> (72 Std.)                    | 0,1 - 100 µg/ml                                                      | Struktur. Aberr.                                                                            | Estradiol<br>Progesteron                                                    | -<br>-                           | STENCHEVER et al., 1969                        |
| Kaninchen <u>in vivo</u><br>Blastozysten                         | 3 mg/Tier i.v.                                                       | Numerische Aberr.                                                                           | Progesteron<br>Estradiol                                                    | ±<br>(+)                         | WIDMEYER und SHAVER,<br>1972                   |
| Hund <u>in vivo</u><br>männl. Keimzellen                         | 1 - 25 mg/Tier<br>i.a.                                               | "stickyness" und Chro-<br>mosomenkondensation<br>Aneu-, Polyploidie                         | Progesteron<br>Progesteron                                                  | +<br>+                           | WILLIAMS et al., 1968<br>WILLIAMS et al., 1971 |

TABELLE 4:  
Untersuchungen mit Sexualsteroidderivaten und OC (Kurzzeittests mit verschiedenen Endpunkten)

| Testsystem                               | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | angegebene Endpunkte in der Studie    | im Test eingesetzte Substanzen    | angenebenes Ergebnis | Literatur              |
|------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>Transformations-</b>                  |                                                         |                                       |                                   |                      |                        |
| test BALB/C3T3                           | 0,05 - 50 µg/ml                                         | Zelltransformation                    | Ethinylestradiol                  | -                    | DUNKEL et al., 1981    |
| SHE-clonal                               | 0,05 - 50 µg/ml                                         |                                       | Ethinylestradiol                  | -                    |                        |
| RLV/RE                                   | 10,2 - 22 µg/ml                                         |                                       | Ethinylestradiol                  | +                    |                        |
| SHE +/- S9-Mix                           | bis 50 µg/ml                                            | Zelltransformation                    | Ethinylestradiol                  | -                    | PIENTA, 1980           |
| <b>DNA-Bindung</b>                       |                                                         |                                       |                                   |                      |                        |
| Ratte <u>in vivo</u>                     | 80 µg/Tier p.o.                                         | Bindung an DNA                        | Ethinylestradiol                  | (+)                  | JAGGI et al., 1978     |
| DCB-Test                                 | 10 und 100 µM                                           | Bindung an DNA                        | Methylprednisolon                 | -                    | KUBINSKI et al., 1981  |
| <b>Salmonella typh./ Mikrosomen Test</b> |                                                         |                                       |                                   |                      |                        |
|                                          | bis 1 mg/Platte                                         | Punktmutationen                       | 6 Estrogene und Progesterone (OC) | -                    | DAYAN et al., 1980     |
|                                          | bis 2,5 mg/Platte                                       | Punktmutationen                       | 5 Estrogene und Progesterone (OC) | -                    | LANG und REDMANN, 1979 |
|                                          | bis 5 mg/Platte                                         | Punktmutationen                       | Progestin (STS 557)               | -                    | SCHÖNEICH et al., 1983 |
|                                          | n.a.                                                    |                                       | 2 Testosteronderiv.               | -                    | SUGIMURA et al., 1977  |
| <b>"rec assays":</b>                     |                                                         |                                       |                                   |                      |                        |
| E. coli                                  | bis 1000 µg/ml                                          | DNA-Reparatur                         | Ethinylestradiol                  | -                    | MAHER et al., 1983     |
| Proteus mirabilis                        | bis 1 mg/Platte                                         | DNA-Reparatur                         | Progestin (STS 557)               | -                    | SCHÖNEICH et al., 1983 |
| Bac. subtilis                            | bis 5 mg/ml                                             | DNA-Reparatur                         | Ethinylestradiol                  | -                    | TANOOKA, 1977          |
| Chines.Hamster V79 mit Aktiv.-system     | 25 - 100 µM                                             | 8 aza <sup>+</sup> , Oua <sup>+</sup> | Ethinylestradiol                  | -                    | DREVON et al., 1981    |

TABELLE 4a:

Untersuchungen mit Sexualsteroidderivaten und oralen Kontrazeptiva (OC) (Mutagenitätstests *in vivo* an Säugern und an *Drosophila*)

| Testsystem                          | eingesetzte Konzentrationen oder Konzentrationsbereiche | Endpunkte in der Studie           | im Test eingesetzte Substanzen | angegebene Ergebnisse | Literatur                   |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| <i>Drosophila melanog.</i>          |                                                         |                                   |                                |                       |                             |
| SRL                                 | bis $10^{-2}$ M                                         | Rezessiv Letale                   | OC-Präparate                   | -                     | PARADI, 1981                |
| SRL und Translokationstest          | n.a.                                                    | Rezessiv Letale Translokationen   | OC (Lyndiol, Ovral)            | -                     | RAO und RAO, 1973           |
| DLT-Maus                            | bis 420 µg/kg i.g.                                      | Dominant Letale Reduz. Fertilität | OC (Anovlar, Lyndiol)          | + ? (+)               | BADR und BADR, 1974         |
| DLT-Maus und zytogenet. Beurteilung | 0,63 mg p.o.                                            | Dominant Letale Trisomien         | Ethinylestradiol-sulfonat      | + +                   | BECKER und SCHÖNEICH, 1981  |
| DLT-Maus und zytogenet. Beurteilung | 1 - 10 mg p.o.                                          | Dominant Letale Numerische Aberr. | Norethisteronazetat            | + +                   | RÖHRBOHN und HANSMANN, 1974 |
| DLT-Maus                            | 1 mg s.c.                                               | Dominant Letale                   | Progestin (STS 557)            | -                     | SCHÖNEICH et al., 1983      |
| DLT-Maus                            | bis 1,6 mg/kg                                           | Dominant Letale                   | OC (Gynovlar und Lyndiol)      | -                     | WALLACE et al., 1979        |
| MNT-Maus                            | 1000mg/kg p.o.                                          | Mikrokerne                        | Ethinylestradiol Gestoden      | - -                   | LANG, pers. Mitteilung      |

TABELLE 4b:

Untersuchungen mit Sexualsteroidderivaten und oralen Kontrazeptiva (OC) (Zyto-genetische Analysen in vitro und in vivo)

| Testsystem<br>oder unter-<br>suchte<br>zellen                             | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                                                   | in Test<br>eingesetzte<br>Substanzen  | ange-<br>benes-<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                   |
|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Knochenmark Ratte                                                         | 20 - 100 mg/kg<br>p.o.                                               | Chromos. Aberr.                                                                                 | Norethindron<br>Mestranol             | -<br>-                           | ANSARI und ADHAMI, 1977     |
| Keimzellen, männl.<br>Patienten <u>in vivo</u>                            | 100 - 200 mg/Tag<br>p.o.                                             | "stickyness", kondensiertes Chromatin, numerische Aberrationen                                  | Medroxyprogesteronazetat              | +                                | CAMACHO et al., 1972        |
| Knochenmark Ratte                                                         | n.a.                                                                 | Zyto-genet. Analyse                                                                             | Depotgestagen                         | -                                | FAIT et al., 1972           |
| Wurzelmeristem<br>Allium cepa und<br>Allium sativum                       | 0,05 u. 1 mg                                                         | Chromos. Brüche<br>Multipolare Anaphasen                                                        | Ethinylestradiol<br>und Lynestrenol   | ±<br>±                           | GOSWAMI, 1978               |
| Pollenmutterzellen<br>Vicia faba                                          | n.a.                                                                 | "stickyness", Anaphase-aberrationen                                                             | OC (Anovlar, Cono-vid, Lyndiol)       | ±                                | HAKHEEM und AMER, 1966      |
| CHL- Fibroblasten<br><u>in vitro</u>                                      | 4 µg/ml<br>± 1 x 10 <sup>-5</sup> M                                  | Chromos. Aberrationen                                                                           | Ethinylestradiol                      | -                                | ISHIDATE und ODASHIMA, 1977 |
| Meiosepräparate<br><u>in vitro</u><br>von Maus, Schaf,<br>Affe und Mensch | 0,1 74,1 µg/ml                                                       | Chromos. Aberrationen<br>Anaphaseverzögerung,<br>Spindelstörungen und<br>Polkörperunterdrückung | verschiedene Estrogene und Progestine | (+)?<br>+                        | JAGIELLO und LIN, 1974      |

TABELLE 4c:

| Testsystem<br>oder unter-<br>suchte<br>Zellen                                  | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                          | im Test<br>eingesetzte<br>Substanzen                       | ange-<br>benes-<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                        |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <u>Untersuchungen mit Sexualsteroidderivaten und oralen Kontrazeptiva (OC)</u> |                                                                      |                                                        |                                                            |                                  |                                  |
| Knochenmark Ratte                                                              | n.a.                                                                 | Chromos. Aberr.                                        | Ethinylestradiol                                           | +                                | KAWACHI et al., 1980             |
| weibl. Humanlym-<br>phozyten <u>in vitro</u>                                   | 2 - 12 mg/ml                                                         | Chromos. Aberr.                                        | Dopo-Medroxy-pro-<br>gesteron (DMPA)                       | +                                | KIRSCH-VOLDERS et al.,<br>1976   |
| <u>in vivo</u>                                                                 | - 450 mg/Person<br>alle 3-6 Monate                                   | Numer. Aberr.                                          |                                                            | -                                |                                  |
| Knochenmark Ratte                                                              | 50 mg / Tier                                                         | Numer. Aberr.                                          |                                                            | -                                |                                  |
| primäre Hautfibro-<br>blasten Mensch                                           | Serum von Frau-<br>en mit OC                                         | Chromos. Aberr.                                        | OC-Kombinations-<br>präparate                              | +                                | LITTLEFIELD und MAILLES,<br>1975 |
| Ratten <u>in vivo</u><br>Hypophyse                                             | 1 mg/Tier                                                            | Mitosearretierung<br>Markerchromosomen,<br>Aneuploidie | Estradiolbenzoat                                           | +                                | MALKOVA et al., 1977             |
| Knochenmark                                                                    | 1 mg/Tier                                                            | Chromos.-morphol.                                      | Estradiolbenzoat                                           | -                                |                                  |
| HeLa -Zellen                                                                   | $2,5 \times 10^{-5}$<br>- $1 \times 10^{-4}$ M                       | Mitotisches n.- d.                                     | Ethinylestradiol<br>Androstan, Andro-<br>steron, Prednison | +                                | RAO und ENGELBERG, 1967          |
|                                                                                |                                                                      |                                                        |                                                            | -                                |                                  |

TABELLE 4d:

| Testsystem<br>oder unter-<br>suchte<br>Zellen                                  | eingesetzte Kon-<br>zentrationen<br>oder Konzentra-<br>tionsbereiche | Endpunkte<br>in der<br>Studie                                     | im Test<br>einge-<br>setzte<br>Substanzen | angege-<br>benes<br>Ergeb-<br>nis | Literatur                    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|
| <u>Untersuchungen mit Sexualsteroidderivaten und oralen Kontrazeptiva (OC)</u> |                                                                      |                                                                   |                                           |                                   |                              |
| Knochenmark Mäus                                                               | 0,1 - 1 mg/Maus<br>i.p.                                              | Chromos. Aberr.                                                   | Progestin (STS 557)                       | -                                 | SCHÖNEICH et al., 1983       |
| Humanlymphozyten<br><u>in vitro</u>                                            | 25 µg/ml<br>( $\cong 8,3 \times 10^{-5}$ M)                          | Polyploidie                                                       | Estrogene und Pro-<br>gestine von OC      | -                                 | SINGH und CARR, 1970         |
| Humanlymphozyten<br><u>in vitro</u> (72Std.)                                   | 0,1 - 100 µg/ml<br>ab Kulturbeginn                                   | Chromos. Aberr.                                                   | Estrogene und Pro-<br>gestine von OC      | -                                 | STENCHEVER et al., 1969      |
| Humanlymphozyten<br><u>in vitro</u> (72Std.)                                   | bis 8,3 µg/ml<br>bis 2,5 µg/ml                                       | Chromos. und numer.<br>Aberrationen                               | Lynestrenol<br>Mestranol                  | -<br>-                            | TIMSON, 1969 b               |
| Kaninchen <u>in vivo</u><br>Blastozysten                                       | 20 µg/Tier i.v.                                                      | Numer. Aberr.                                                     | Estradiol-<br>propionat                   | (+)                               | WIDMEYER und SHAVER,<br>1972 |
| Chines. Hamster<br><u>in vivo</u><br>weibl. Keimzellen                         | 1 - 100 µg/Tag<br>s.c.                                               | "stickiness", Chro-<br>mosomenkondensation<br>und Anaphasebrücken | Medroxypro-<br>gesteron                   | +                                 | WILLIAMS et al., 1972        |

TABELLE 4e:

Zyto genetische Untersuchungen mit oralen Kontrazeptiva (OC) (Analysen an spontan oder induziert abortierten Feten von Frauen, die vor oder während der Schwangerschaft OC eingenommen hatten)

| Art der Studie                                                                                        | angegebene Endpunkte u. Ergebnis in der Studie | (+) ? | Literatur                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------|
| fetales Gewebe von 992 spontanen Aborten, Chromosomenanalyse                                          | Numerische und strukturelle Aberrationen       | -     | ALBERMAN et al., 1976                             |
| fetales Gewebe von 1498 spontanen Aborten, Karyotypisierung                                           | Numerische und strukturelle Aberrationen       | -     | BOUE und BOUE 1973 a,b; BOUE et al., 1975 a,b     |
| Amnion- und Choriongewebekulturen von: 8 spontanen Aborten (8-10-Tage-Kulturen)                       | Numerisch aberrante Karyotypen                 | +     | CARR, 1967                                        |
| 54 spontane Aborte (OC-Gruppe im Vergleich zu Kontrollgruppe)                                         | Polyploidien<br>Aneuploidien                   | +     | CARR, 1970                                        |
| fetales Gewebe von 459 induzierten Aborten                                                            | Abweichender Karyotyp                          | -     | KAJII und OHAMA, 1972                             |
| OC-Historie von 17 Frauen mit polyploiden Feten (induzierte Aborte)                                   | Korrelation OC-Einnahme                        | -     | KAJII und NIIKAWA, 1977                           |
| fetales Gewebe von 98 spontanen und 1233 induzierten Aborten                                          | Chromosomenanalyse                             | -     | KLINGER et al., 1976<br>KLINGER und GLASSER, 1977 |
| fetales Gewebe von 246 spontanen Aborten, (Langzeitkulturen)                                          | Abweichender Karyotyp                          | -     | LAURITSEN, 1975                                   |
| fetales Gewebe von 7 induzierten Aborten von Frauen, die während der Konzeption OC eingenommen hatten | Abweichender Karyotyp<br>(2 Aneuploidien)      | ± ?   | WEISE, 1975                                       |

TABELLE 4f:

Zyto genetische Analysen mit oralen Kontrazeptiva (OC), (Untersuchungen an Neugeborenen, deren Mütter vor der Schwangerschaft OC eingenommen hatten)

| Art der Studie                                                                                                                                           | angegebene Endpunkte u. Ergebnis in der Studie                                                   | Literatur                 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Peripheres Venenblut (72 Std.-Kulturen), 108 Kinder und 108 Kontrollen                                                                                   | Struktur. Aberrationen<br>Numerische Aberrationen ±                                              | BISHUN et al., 1975       |
| Blutkulturen von 154 Kindern, Vergleich mit 157 Kontrollen                                                                                               | Struktur. Aberrationen -<br>Numerische Aberrationen -                                            | BISHUN, 1976              |
| Blutkulturen mit Nabelvenenblut von 1670 Neugeborenen                                                                                                    | Chromosomenanalyse -                                                                             | KLINGER und GLASSER, 1977 |
| Peripheres Venenblut und Nabelvenenblut (48 u. 72 Std.-Kulturen) von 50 (+23) Kindern und 20 Kontrollen, OC-Komponenten Mestranol und Chlormadinonazetat | Struktur. Aberrationen +<br>(Brüche)                                                             | MC QUARRIE et al., 1970   |
| Peripheres Venenblut (72 Std.-Kulturen) von 185 Kindern und 181 Kontrollen                                                                               | Strukt. u. numer. Aberr. -                                                                       | MILLS et al., 1975        |
| Chromosomenanalyse an 11148 Neugeborenen Kulturmethode (n) nicht aufgeführt                                                                              | Strukturelle Aberrationen -<br>Numer. Aberr. (bei Einnahme von Estrogen/Progestin-Kombination) + | NIELSEN et al., 1982      |
| Abstriche der Wangenschleimhaut und Lymphozytenkulturen von 61 Neugeborenen                                                                              | Sex-Chromatin -<br>Strukt. u. numer. Aberr. -                                                    | RICE WRAY et al., 1970    |

TABELLE 4g:

Zyto genetische Analysen mit hormonalen Kontrazeptiva (Frauen, die vor oder während der zyto genetischen Analyse hormone Kontrazeptiva verwendeten)

| Art der Studie                                                   | Kultur-<br>dauer (Std.) | angegebene Endpunkte<br>in der Studie     | Ergeb-<br>nis | Literatur                  |
|------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------------|---------------|----------------------------|
| Peripheres Venenblut von:                                        |                         |                                           |               |                            |
| 70 Frauen nach OC-Einnahme                                       | 72                      | Veränderter Mitoseindex                   | -             | BISHUN et al., 1976 a,b    |
| 77 Frauen nach OC-Einnahme                                       | 72                      | Strukt. u. numer. Aberr.                  | -             | BISHUN et al., 1975        |
| 114 Frauen nach Absetzen des Prä-<br>parats gegen 124 Kontrollen | n.a.                    | Chromosomenanalyse                        | -             | BISHUN, 1976               |
| 25 Frauen vor und während<br>OC-Einnahme                         | 48                      | Strukt. u. numer. Aberr.                  | -             | DOMANY et al., 1975        |
| 11 Frauen vor und mit Depot-Gestagen                             | 68/72                   | Chromosomenanalyse                        | -             | FAIT et al., 1972          |
| 17 Frauen während OC-Einnahme<br>(gleichartige Kontrollgruppe)   | 48                      | Numerische Aberrationen                   | -             | FITZGERALD et al., 1973    |
| 5 Frauen während OC-Einnahme                                     | n.a.                    | Chromosom. Bruchrate<br>Hyper-Hypoploidie | +?<br>(+)     | GOH, 1967                  |
| 35 Frauen während OC-Einnahme                                    | 65                      | "abnormalities"                           | -             | GUTIERREZ und LISKER, 1973 |

TABELLE 4h:

| Art der Studie                                                                                                                                                   | Kultur-<br>dauer (Std.) | angegebene Endpunkte<br>in der Studie | Ergeb-<br>nis | Literatur                      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------------|--------------------------------|
| <u>Zyto genetische Analysen mit hormonalen Kontrazeptiva (Frauen, die vor oder während der zyto genetischen Analyse<br/>hormonale Kontrazeptiva verwendeten)</u> |                         |                                       |               |                                |
| Peripheres Venenblut von:                                                                                                                                        |                         |                                       |               |                                |
| 5 Frauen während OC-Einnahme                                                                                                                                     | 72                      | Chromosom. Aberrationen               | -             | LITTLEFIELD und MAILLES, 1975  |
| 54 Frauen vor, während und ohne<br>OC-Einnahme                                                                                                                   | 72                      | Chromosom. Aberrationen               | ±             | LITTLEFIELD et al., 1975       |
| 32 Frauen während oder nach<br>OC-Einnahme                                                                                                                       | 72                      | Strukt. u. numer. Aberr.              | -             | MAITON-VAN LEUVEN et al., 1974 |
| 23 Frauen während OC-Einnahme<br>(Mestranol plus Chlormadinonazetat)                                                                                             | 48u.72                  | Chromosom. Aberrationen               | +?            | MC QUARRIE et al., 1970        |
| 185 Frauen nach OC-Einnahme                                                                                                                                      | 72                      | Strukt. u. numer. Aberr.              | -             | MILLS et al., 1975             |
| 33 Frauen während OC-Einnahme (lang-<br>fristige/kurzfristige Einnahme,<br>10 Frauen nach Absetzen der OC                                                        | 72                      | Strukt. u. numer. Aberr.              | -             | MÜLLER und RITTER, 1978        |
| 7 Frauen vor und während OC-Einnahme                                                                                                                             | 72                      | Chromosom. Aberrationen               | -             | SHAPIRO et al., 1972           |
| 19 Frauen während OC-Einnahme                                                                                                                                    | 72                      | Strukt. und numer. Aberr.             | -             | TIMSON, 1969 b                 |

TABELLE 4i:

SCE-Analysen mit hormonalen Kontrazeptiva in vivo.  
Peripheres Venenblut, 3 Tage-Kulturen, Medium 199

| OC-Präparate                                                  | Untersuchte Gruppen                                                              | Ergebnis | Literatur              |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------|------------------------|
| verschiedene orale Kontrazeptiva                              | 131 Frauen mit Brusttumoren<br>Einfluß von OC auf die SCE-Rate                   | -        | HUSUM et al., 1981     |
| verschiedene Estrogen-Gestagen-Kombinationspräparate          | 52 Frauen mit Einnahme von OC<br>63 Frauen ohne Medikation                       | -        | HUSUM et al., 1982     |
| Estrogen-Gestagenkombination<br>(Norgestrel/Ethinylestradiol) | 15 Frauen mit Einnahme von OC<br>15 Frauen ohne OC (Kontrollen)<br>15 Schwangere | +        | MURTHY und PREMA, 1979 |
| Estrogen-Gestagenkombination<br>(Norgestrel/Ethinylestradiol) | 20 Frauen mit Einnahme von OC<br>30 Frauen ohne OC (Kontrollen)<br>20 Schwangere | +        | MURTHY und PREMA, 1983 |
| Depotgestagen (Norethindron-<br>enanthat)                     | 10 Frauen mit Depothormon                                                        | -        | MURTHY und PREMA, 1983 |

Die natürlich vorkommenden Sexualsteroidoide und Steroidderivate sind schon in einer Vielzahl von Studien auf ihre mutagenen Eigenschaften untersucht worden. Es kann davon ausgegangen werden, daß die natürlichen Steroide keine Genmutationen induzieren; hinsichtlich der Induktion von strukturellen und numerischen Chromosomenaberrationen ist keine klare Aussage zu treffen.

Es bestehen berechnigte Gründe für die Annahme, daß einige der Sexualsteroidoide in der Lage sind, numerische Chromosomenaberrationen zu induzieren. Die in einigen Studien beobachteten aberranten Formen der Zellteilung in Verbindung mit unspezifischen Veränderungen der Chromosomenmorphologie deuten auf eine Hemmung der Mitose hin und auf Mechanismen, die möglicherweise zu numerischen Chromosomenaberrationen führen.

Die Untersuchungen mit Steroidderivaten führen zu grundsätzlich gleichartigen Überlegungen. Es schien deshalb erforderlich, einige der natürlichen Sexualsteroidoide noch einmal auf strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen umfassend zu untersuchen. Dazu wurden die wichtigsten natürlichen Sexualsteroidoide mit estrogener, gestagener und androgener Wirkung ausgewählt.

Außerdem wurde in diese Studie das künstliche Estrogen Diethylstilbestrol mit einbezogen, weil diese Substanz als Nichtsteroid vergleichbare hormonelle Eigenschaften wie die steroidalen Estrogene besitzt. DES ist besonders häufig und in einer Vielzahl von Mutagenitätstests überprüft worden, weil diese Substanz sehr spezifisch die Häufigkeit bestimmter Krebserkrankungen erhöht. Dabei wurde ein ursächlich krebserzeugender Mechanismus angenommen, der über mutagene Ereignisse wirksam ist. Es wurde deshalb erwartet, daß DES in der Lage ist, Mutationen (DNA-Schädigungen) zu induzieren. Die Resultate bestätigten das nicht. Vielmehr wurde mit DES ein ebenso uneinheitliches Bild gewonnen, wie es die Steroidhormone zeigen. Es wurde deshalb die Möglichkeit diskutiert, daß DES selbst nicht mutagen ist, sondern erst durch den Stoffwechsel in ein ultimates Mutagen überführt werden muß.

Die Steroide und das DES wurden deshalb gemeinsam einer Studie unterzogen, in der die Substanzen über einen großen Konzentrationsbereich auf die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen und SCEs in Humanlymphozyten in vitro untersucht wurden. Der Möglichkeit, daß Stoffwechselprodukte der Substanzen mutagene Eigenschaften haben könnten, wurde Rechnung getragen, indem Versuchsreihen mit metabolischer Aktivierung durchgeführt wurden.

Das Fungizid MBC wurde in gleicher Weise wie die Hormone auf die Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen und SCEs überprüft. Von MBC war bekannt, das es Genmutationen, Mikrokerne, aberrante Zellteilungen und mitotisches non-disjunction induziert. Eine eingehende Untersuchung auf strukturelle Chromosomenaberrationen und SCEs war mit MBC noch nicht durchgeführt worden.

Des weiteren wurde untersucht, ob MBC, DES oder Estradiol in Humanlymphozyten in vitro numerische Chromosomenaberrationen induziert. Für MBC konnte aufgrund der Informationen aus der Literatur eine solche Wirkung angenommen werden. Deshalb wurde MBC als „positive Kontrolle“ verwendet. Zum Nachweis von numerischen Aberrationen wurde die Mitoserate, die Mikrokernrate und die Häufigkeit von Polyploidien ermittelt. Mit der C-Bandenfärbung und der Auswertung von Chromozentren in Mikrokernen wurde ein Unterscheidungskriterium zwischen der Induktion von strukturellen oder numerischen Aberrationen erprobt.

## 2.MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Aufgabenstellung und Testsystem

Methyl 2-benzimidazolcarbamat(MBC), Diethylstilbestrol(DES) und die Steroidhormone Estradiol, Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon wurden im menschlichen Leukozytentestsystem auf mutagene Wirkungen in vitro überprüft. Die Testsubstanzen wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, strukturelle Chromosomenaberrationen oder erhöhte SCE-Raten zu induzieren. Die Untersuchungen erfolgten ohne und mit metabolischer Aktivierung. Der getestete Konzentrationsbereich erstreckte sich je nach Löslichkeit der Substanzen von  $10^{-8}$  M bis maximal  $10^{-3}$  M Endkonzentration in den Kulturen.

Die Substanzen MBC, DES und Estradiol wurden als Testsubstanzen zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen im menschlichen Leukozytentestsystem in vitro eingesetzt. Als Auswertungskriterien wurden arretierte Mitosen, Mikrokerne und Polyploidien verwendet. In diesen Versuchen betrug die höchste getestete Konzentration  $10^{-4}$  M.

Die Experimente wurden mit Vollblutkulturen durchgeführt. Zur Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen wurde die Blutkulturmethode von DUDIN et al. (1974) mit Medium HAM's F 10 und zur Auswertung der SCE - Raten die modifizierte Methode von OBE et al. (1975) mit Medium TC 199 angewendet.

### 2.2. Zellmaterial und Kultivierung

Für die Experimentalansätze wurde das periphere Venenblut gesunder Spender ein bis dreißig Stunden vor dem Kulturan-satz mit einer heparinisierten Spritze (Liquemin, HOFFMANN - LA ROCHE) aus der Armvene entnommen.

#### Liste der Blutspender:

##### a) männliche Spender

- A: J.T., 23J. N.R., Röntgenaufnahme des Thorax
- B: J.K., 25J. ExR., keine
- C: K.P., 27J. R., keine
- D: N.B., 32J. R., keine
- E: H.S., 31J. ExR., keine
- F: M.L., 33J. R., keine
- G: G.S., 36J. N.R., Keine
- H: F.S., 40J. R., Röntgenaufnahme des Thorax
- I: P.G., 44J. N.R., Noctamid

b) weibliche Spender

K: H.R., 20J. N.R., keine  
L: K.L., 22J. R., orale Kontrazeptiva  
M: S.Z., 22J. N.R., orale Kontrazeptiva  
N: M.L., 22J. R., orale Kontrazeptiva  
O: K.M., 24J. R., keine  
P: A.F., 26J. R., orale Kontrazeptiva  
Q: J.K., 28J. N.R., orale Kontrazeptiva  
R: J.S., 31J. R., orale Kontrazeptiva  
S: B.O., 31J. N.R., keine  
T: C.K., 32J. R., orale Kontrazeptiva  
U: B.K., 33J. R., keine  
V: M.F., 35J. R., keine  
W: G.S., 39J. N.R., keine  
X: U.S., 46J. R., keine

(1.Buchstabe: Kennbuchstabe für die Versuche, nachfolgend Namenskürzel, Alter, Raucher/Nichtraucher/Exraucher und medikamentöse- oder Strahlenexposition vor dem Zeitpunkt der Blutentnahme.)

2.2.1. Kulturansatz

Eine Vollblutkultur zur Leukozytenkultivierung besteht aus:

- 4,0 ml Medium HAM's F 10, bzw. TC 199 (SEROMED)
- 0,5 ml Fötale Kälberserum, inaktiviert (FLOW)
- 0,12 ml Phytohämagglutinin - M (PHA), gelöst in Kulturmedium (DIFCO)
- 0,02 ml Penicillin-Streptomycin Gemisch, bestehend aus 100 I.E. Penicillin (HOECHST) und 1 mg Dihydrostreptomycin (HEYL)
- 0,4 ml Peripheres Venenblut

Zur differentiellen Chromatidenmarkierung zwecks Bestimmung der SCE - Raten in 2. Mitosen und für Zellzyklusanalysen zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der Lymphozyten nach Substanzbehandlung wurde den Kulturen Bromdesoxyuridin (BUdR) zugegeben:

- 0,05 ml  $10^{-3}$  M BUdR (Endkonzentration  $10^{-5}$  M im Kulturmedium (SERVA))

Sämtliche Blutkulturen wurden in sterilen Einwegzentrifugenröhrchen aus Plastik mit verschließbarer Kappe kultiviert (Volumen 15 ml, FALCON Typ 17/100) und im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

In den Versuchen zur Bestimmung der strukturellen Chromosomenaberrationen oder der SCE - Raten wurde zur Anreicherung von C - Metaphasen das Metaphase-arretierende Spindelgift Colcemid zugegeben. Die Zugabe erfolgte vier Stunden vor Aufarbeitung mit 0.2 ml einer Colcemidlösung (2 µg/ml, (SERO-MED)). Das entspricht einer Endkonzentration im Kulturmedium von 0,08 µg/ml.

### 2.3. Aufarbeitung

Nach Beendigung der Kultivierungsphase erfolgte die Aufarbeitung nach folgendem Schema:

1. Zentrifugieren der Kulturen, 10 Minuten mit 120 g (das entspricht etwa 800 Umdrehungen pro Minute (UpM) mit einer Heräus Tischzentrifuge).
2. Absaugen des Überstands.
3. Resuspension des Sediments unter Zugabe von 4,0 ml einer 0,075 M Kaliumchloridlösung (37° C) und anschließende Inkubation bei 37° C für 15 Minuten (Hypotoner Schock).
4. Zentrifugieren mit 800 UpM für 10 Minuten und Absaugen des Überstands.
5. Resuspension des Sediments unter Zugabe von 4,0 ml eines unmittelbar vorher zubereiteten Methanol/Eisessiggemisches (3 + 1), (Methanol p.a., 4° C, Essigsäure p.a., 100%). Während der Zugabe gründlich resuspendieren, weil sonst das Zellmaterial verklumpt (Fixierung).
6. Zentrifugieren mit 800 UpM für 10 Minuten und Absaugen des Überstands.
7. Zwei- bis dreimalige Wiederholung von 5. und 6. bis die gereinigte Zellsuspension klar ist (Waschen).

8. Sediment mit wenig (ca. 0,6 ml) Fixiergemisch resuspendieren und auf gereinigte eisgekühlte Objektträger auftragen. Die Zellsuspension kann auf 3 bis 4 Objektträger verteilt werden.
9. Lufttrocknung der Präparate unter einer Lampe (Abstand zwischen Präparat und Glühbirne etwa 5 cm).

#### 2.4. BUdR - Einbau

Zur Differenzierung der Schwesterchromatiden ist die früher übliche autoradiographische  $^3\text{H}$  - Thymidinmarkierung weitgehend durch die schnellere und leichter zu handhabende BUdR-Methode ersetzt worden. Wird Zellen für die Dauer von zwei Zellzyklen Bromdesoxyuridin (BUdR), ein Basenanalogen des Thymin, angeboten, dann wird von den Zellen in der Replikationsphase BUdR statt Thymin in die DNS eingebaut. Nach zwei aufeinanderfolgenden Replikationszyklen mit BUdR ist eine Chromatide in nur einem Strang, die zweite Chromatide in beiden Strängen der DNS - Doppelhelix mit BUdR substituiert. In der folgenden Mitose lassen sich die Schwesterchromatiden differentiell anfärben. Doppelt substituierte Chromatiden sind dann weniger stark angefärbt als einfach substituierte Chromatiden ("sister chromatid differentiation": SCD).

Durch diese von LATT (1973) beschriebene Technik können mitotische Zellen voneinander unterschieden werden, die ein, zwei oder drei und mehr S-Phasen in Gegenwart von BUdR durchlaufen haben (nachfolgend 1., 2. und 3. Mitosen genannt). In 1. Mitosen sind alle Chromosomen gleichmäßig angefärbt, in 2. Mitosen sind alle Chromosomen differentiell gefärbt und in 3. Mitosen sind nur etwa 50% der Chromosomen einer Zelle differentiell gefärbt. Durch die Anteile 1., 2. und 3. Mitosen eines Präparats können Aufschlüsse über das Proliferationsverhalten einer Zellpopulation gewonnen werden. In 2. Mitosen können die Häufigkeiten von Austausch zwischen den Schwesterchromatiden (SCE) ermittelt werden. Die Konzentration des BUdR in den Blutkulturen ( $10^{-5}$  M) ist so gewählt, daß noch kein nachweisbarer Effekt auf den Zellzyklus (Verzögerung) und die SCE - Rate (Erhöhung) eintritt (KATO, 1974; TICE et al., 1976). Die BUdR-Kulturen wurden zur Verhinderung einer Photolyse der BUdR-substituierten DNA vor Licht geschützt (IKUSHIMA und WOLFF, 1974)

## 2.5. Zentromerisches Heterochromatin

Die Methode, das konstitutive Heterochromatin des Zentromerbereichs dunkler anzufärben als das restliche Chromatin, (C-Bandenfärbung) wurde von PARDUE und GALL (1970) entdeckt. ARRIGHI und HSU (1971) und SUMNER (1972) vereinfachten das Verfahren der C-Bandenfärbung. Diese Methode dient seitdem hauptsächlich der Zuordnung von aberranten Chromosomen bzw. Trisomien zum ursprünglich mütterlichen oder väterlichen Genom.

In dieser Arbeit wurde die C-Bandenfärbung eingesetzt. Durch Kennzeichnung des Zentromers in Mitosen können Rückschlüsse auf Zentromerregionen in Interphasekernen gezogen werden.

## 2.6. Präparatfärbung

### 2.6.1. Giemsa - Normalfärbung

Es wird ein Gemisch aus 5 % Giemsaatlösung (Azur - Eosin - Methylenblau, (MERCK)), 15 % Phosphatpuffer (pH 6,88; 0,025 M ; (MERCK)) und 80 % Aqua dest. hergestellt und durch ein Faltenfilter gefiltert. In diesem Gemisch werden die Präparate 8 bis 10 Minuten gefärbt, danach zweimal in Aqua dest. gespült und luftgetrocknet.

2.6.2. Zur differentiellen Anfärbung der Schwesterchromatiden wurde eine modifizierte Methode nach PERRY und WOLFF (1974) angewandt:

1. Mindestens drei Tage alte Präparate 12 Minuten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 behandeln (Konzentration 3 µg/ml; (RIEDEL- DE HAEN)), Spülen mit Aqua dest.
2. Objektträger mit PBS ("phosphate buffer saline", Zusammensetzung: 0,025 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  und 0,025 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , gelöst in Aqua dest. plus 0,15 M NaCl) spülen und besprühen.
3. Objektträger in feuchter Kammer etwa 30 bis 60 Minuten mit ultravioletem Licht (UV) exponieren (UV-Lampe Typ Philips G 15 T 8, 2 x 15 W, Bestrahlungsabstand 10 cm). Beachten, daß Objektträger während der Exposition nicht austrocknen.

4. Mit Aqua dest. spülen und in 6xSSC ("sodium saline citrate", Zusammensetzung: 0,9 M NaCl und 0,09 M tri-Natriumzitat, gelöst in Aqua dest.) einstellen, bis zum Erreichen von 60° C in der Küvette. Temperatur in der Küvette vorher auf 60° C einregulieren, nach Einstellen der Objektträger wird die Temperatur nach 15 bis 20 Minuten wieder erreicht.
5. Spülen mit Aqua dest. und anschließend Giemsa-Normalfärbung für 6 bis 7 Minuten.

Modifikation der Bestrahlung (Punkt 3): Statt der Exposition mit UV wurde die Bestrahlung mit Schwarzlicht (Typ Philips F 20 B 12 BLB, 2x20 W, Bestrahlungsabstand 5 cm) ohne feuchte Kammer, mit Wärmeplatte bei 60°C für 10 Minuten durchgeführt (Während der Bestrahlung Objektträger mit PBS benetzt halten!); (HILL und WOLFF, 1982).

#### 2.6.3. Heterochromatin - Anfärbung, modifiziert nach SUMNER (1972)

1. Mehrere Tage gealterte Präparate in 30° C warme, 1 N HCl für 30 Minuten einstellen.
2. In Aqua dest. gründlich spülen, bis der pH-Bereich wieder neutral ist.
3. Objektträger in 5% filtrierte Bariumhydroxid-Lösung ( $\times 8 \text{ H}_2\text{O}$ ) für 15 bis 45 Sekunden bei 50° C einstellen.
4. Sofort in Aqua dest. gründlich spülen, bis der pH-Bereich wieder neutral ist.
5. Einstellen in 6 x SSC bei 60° C für 20 Minuten.
6. In Aqua dest. gründlich spülen und anschließend Giemsa-Normalfärbung.

Alle Präparate wurden durch Einstellen in Xylol entwässert und in Eukitt eingebettet (Dauerpräparate).

## 2.7. Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Leitz Mikroskop Typ: Orthoplan mit Weitwinkelokularen mit 10-facher Vergrößerung und Objektiven mit 10-, 25-, 40- und 100-facher (Ölimmer-sion) Vergrößerung.

Ausgewertet wurden je nach Aufgabenstellung: Strukturelle Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidenaustausche (SCE), Mitoseindices, das Verhältnis 1. zu 2. zu 3. Mitosen, Mikrokerne, C - Banden, Interphasekerne (Hauptkerne und Mikrokerne) mit heterochromatischen Bereichen und polyploide Mitosen.

Alle Auswertungen erfolgten an codierten Präparaten, decodiert wurde erst nach Beendigung der Auswertung einer Experimentalserie.

## 2.8. Substanzen und Behandlungen

### 2.8.1. Testsubstanzen

1. Methyl 2-benzimidazolcarbamat (MBC, DU PONT), Molekulargewicht (Mg): 191,18; ohne Chargennummer, Lieferung vom 27.3.1981
2. Diethylstilbestrol (DES, Hersteller nicht bekannt), Mg: 268,34; Charge: 29C-0318 vom 27.3.1981
3. Estradiol (SCHERING), Mg: 272,4; Charge: 10 025 510 vom 1.4.1981
4. Estron (SCHERING), Mg: 270,4; Charge: 10 025 557 vom 1.4.1981
5. Progesteron (SCHERING), Mg: 314,5; Charge: 29 017 894 vom 6.4.1981
6. Testosteron (SCHERING), Mg: 288,4; Charge: 20 025 873 vom 1.4.1981
7. Androstanolon (SCHERING), Mg: 290,4; Charge: 26 016 314 vom 6.4.1981

Die Testsubstanzen wurden von der Fa. SCHERING zur Verfügung gestellt.

Alle Substanzen sind in Ethanol und Dimethylsulfoxid (DMSO) löslich. Die Löslichkeit in DMSO ist höher, sie liegt zwischen  $4 \times 10^{-2}$  M (MBC) und  $> 1 \times 10^{-1}$  M (DES).

#### 2.8.2. Positive Referenzsubstanzen

1. Trenimon (BAYER), Mg: 231,25; Charge Pt 170 809
2. Cyclophosphamid, Mg: 261,10; als Endoxan (ASTA) in Injektionsampullen mit 100 mg Cyclophosphamid und 45 mg Natriumchlorat, Charge 9372
3. Demecolcin (Colcemid, SEROMED), Mg: 371,42; Charge 10405

Die Referenzsubstanzen wurden in Aqua bid. gelöst und steril filtriert.

#### 2.8.3. Behandlung

Die Substanzen wurden unmittelbar vor der Behandlung ausgewogen und gelöst. Zum Behandlungsbeginn (siehe Versuchsplan) wurden 50  $\mu$ l (bzw 60  $\mu$ l in Versuchen mit metabolischer Aktivierung), entsprechend 1% Lösungsmittel in den Kulturen, zugegeben.

Die Konzentrationsangaben bei sämtlichen Behandlungen beziehen sich auf die Endkonzentration in der Blutkultur. Die Stammlösungen waren gegenüber der Endkonzentration 100-fach höher konzentriert; es wurden Verdünnungsreihen von den höchsten Konzentrationen hergestellt.

Der Behandlungsbeginn, die Dauer der Substanzbehandlung und die eingesetzten Konzentrationen sind dem Versuchsplan zu entnehmen.

#### 2.9. Metabolische Aktivierung

Bei der Behandlung von Blutkulturen unter Einschluß metabolischer Aktivierung wird mit den Testsubstanzen ein Aktivierungssystem in die Blutkulturen eingebracht, das die Substanzen unter in vitro - Bedingungen verstoffwechseln soll.

Das Aktivierungssystem mit Lebermikrosomen aus Leberhomogenaten der Maus oder der Ratte wurde für Lymphozytenkulturen von BIMBOES und GREIM (1976) erarbeitet und von MADLE (Dissertation FU-Berlin, 1980) mit Cyclophosphamid weiterent-

wickelt. Als erfolgreichste Methode zum Nachweis indirekter Mutagene, die erst durch Stoffwechselprozesse aktiviert werden müssen, erwies sich bei in vitro - Versuchen mit Blutkulturen die Zugabe von Mikrosomen mittels Dialyseschläuchen (indirekte Applikation des Aktivierungsgemisches (S9-Mix)), (MADLE und OBE, 1977). Eine direkte Applikation der Mikrosomenfraktion wirkt auf die Zellen im Blutkultursystem stark toxisch, so daß nur eine begrenzte Applikationsdauer möglich ist, nach der die Mikrosomen (und damit auch die Substanzen und möglichen Metabolite) ausgewaschen werden müssen. Diese Pulsbehandlung hat den Nachteil, daß die Zellen nur über relativ kurze Zeiträume und während bestimmter Zellzyklusphasen (bei synchronen Zellen) den Substanzen ausgesetzt sind. Diesen Nachteil kann man ausgleichen, indem das Aktivierungsgemisch in einen Dialyseschlauch eingeschlossen wird und im Dialyseschlauch den Blutkulturen zugesetzt wird. Die Lebermikrosomen können unter diesen Bedingungen für längere Zeit ohne zytotoxische Einflüsse in der Kultur verbleiben. Nach dem Entfernen des Dialyseschlauchs verbleiben die Substanzen in den Kulturen und wirken weiter auf die Zellen ein.

Ein möglicher Nachteil dieser indirekten Applikation des Aktivierungsgemisches ist, daß Metaboliten nicht bis zur Reaktion mit der DNS des Zellkerns gelangen. Dies kann bei sehr kurzlebigen Metaboliten der Fall sein, oder durch Bindung der Metaboliten an Proteine.

Einer solchen Möglichkeit kann Rechnung getragen werden, wenn die metabolische Aktivierung nach beiden Methoden durchgeführt wird.

- Direkte Applikation des S9-Mix
- Indirekte Applikation des S9-Mix mittels Dialyseschlauch

Die Experimente mit metabolischer Aktivierung wurden gegenüber den Experimenten ohne metabolische Aktivierung unter veränderten Versuchsbedingungen durchgeführt. Vor der Behandlung mit S9-Mix und den Testsubstanzen wurde 46 Stunden kultiviert (Präinkubation).

### 2.9.1. Materialien für die metabolische Aktivierung

Für die metabolische Aktivierung wurde die S9-Fraktion der Leber Arochlor-1254-induzierter Ratten verwendet. Diese Aktivierungsfraktion ist als Fertigsupstrat zu beziehen (LIT-TON BIONETICS). Die S9-Fraktionen wurden im Tiefkühlschrank

bei - 80°C nicht länger als sechs Monate gelagert. In den Versuchen wurden verschiedene Chargen verwendet (Die Verwendung der jeweiligen Charge in den Versuchen ist in der Auflistung der Experimentalserien aufgeführt):

Charge Nr.: REL 091 vom 30.12.1981, Proteingehalt (Pg) 30,0 mg/ml, Enzymaktivität (Benz(a)pyrenhydroxylase (Bph-Akt.)) 6,5 nmol Hydroxybenzpyren / 20 Minuten / mg Protein.

Charge Nr.: REL 093 vom 11.01.1982, Pg 29,9 mg/ml, Bph-Akt. 3,26 nmol.

Charge Nr.: RFC 032 vom 15.03.1982, Pg 35,7 mg/ml, Bph-Akt. 7,89 nmol.

Charge Nr.: RFI 115 vom 14.09.1982, Pg 21,2 mg/ml, Bph-Akt. 14,8 nmol.

Bei der Aktivierung mit Lebermikrosomen wurde Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (NADP, Mg: 787,4; BOEHRINGER) und Glucose-6-phosphat (G-6-P, Mg: 304,2; BOEHRINGER) in Form von Dinatriumsalzen verwendet.

Die indirekte Applikation wurde mit Dialyseschläuchen des Typs SERVA 8/32, Durchmesser 1 cm, Porengröße 15 - 20 Å, Ausschlußgröße 10 000 bis 20 000 Dalton ausgeführt.

#### 2.9.2. Herstellung des Aktivierungsgemisches (S9-Mix) aus der S9-Fraktion

Eine maximale Aktivierung von Cyclophosphamid erreichte MAD-LE (1981, pers.Mitteilung) durch einen Anteil von 0,5% bis 4% S9-Fraktion in den Zellkulturen. Dazu wird die S9-Fraktion so verdünnt, daß bei Zugabe von 1 ml der verdünnten S9-Fraktion der gewünschte prozentuale Anteil erreicht wird.

Als Lösungsmittel diente das gleiche Kulturmedium, mit dem die Zellkulturen angesetzt wurden. Diesem Medium wurde NADP und G-6-P zugesetzt. Die Endkonzentration in den Kulturen betrug 1mM NADP und 2mM G-6-P.

In den durchgeführten Versuchen wurde als Konstante für die Konzentrationsberechnung des S9-Mix der Proteingehalt der S9-Fraktion zugrunde gelegt, wodurch unterschiedlich hohe Proteinanteile der verschiedenen Chargen berücksichtigt wurden. Ein Proteinanteil von 0,6 mg/ml Kulturflüssigkeit entspricht einem prozentualen Anteil von 1,7 bis 2,8% S9-Fraktion.

Berechnungsbeispiel für den S9-Mix anhand der Charge RFI 115 :

Proteinanteil der S9-Fraktion: 21,2 mg/ml

0,6 mg Proteinfraction pro ml Kulturflüssigkeit entspricht 3,6 mg pro Kultur (5 ml Kulturflüssigkeit plus 1 ml Aktivierungsgemisch):  $3,6 : 21,2 = 0,17$  ml S9-Fraktion/Kultur. Das entspricht 2,8% S9-Fraktion/Kultur.

#### 2.9.3. Behandlungsablauf bei direkter Zugabe des S9-Mix zu den Blutkulturen

1. Abwiegen, Lösen und Verdünnen der Testsubstanzen, der Referenzsubstanzen und der Coenzyme.
2. Auftauen der S9-Fraktion im Eiswasserbad und Verdünnung mit Medium plus Coenzymen.
3. Zugabe des BUdR (60  $\mu$ l), des S9-Mix (1 ml) und der Testsubstanzen (60  $\mu$ l) zu den Blutkulturen.
4. Resuspendieren der Kulturen und Inkubation im Brutschrank bei 37° C für 1 Stunde.
5. Auswaschen des S9-Mix und der Substanzen.

#### 2.9.4. Veränderter Behandlungsablauf bei indirekter Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch

Die Dialyseschläuche wurden einen Tag bis einige Stunden vor Behandlungsbeginn zum Entfernen gebundener Salze 10 Minuten in  $10^{-4}$  M Ethylendinitrilotetraessigsäure (EDTA, MERCK) gekocht, mehrfach in Aqua dest. gespült und zur Sterilisation 10 Minuten in Aqua dest. gekocht. Nach Vorbereitung des S9-Mixes wurden die Dialyseschläuche unter Sterilbedingungen an einem Ende verknotet, 1 ml des Aktivierungsgemisches einpipettiert und unter Einschluß einer Luftblase am anderen Ende verknotet. Die Luftblase ist nötig, weil für die Aktivierungsreaktion Sauerstoff vorhanden sein muß. Zur Vermeidung von Infektionen wurden die Arbeiten mit sterilen Handschuhen und Arbeitsmaterialien ausgeführt.

Das Aktivierungsgemisch verblieb 3 Stunden in den Blutkulturen. Danach wurden die Dialyseschläuche entfernt. Die Substanzen verblieben je nach Versuchsansatz bis zur Aufarbeitung in den Kulturen, oder wurden ausgewaschen (Dauer der Substanzeinwirkung ist dem Versuchsplan zu entnehmen).

### 2.9.5. Arbeitsschritte beim Waschen der Kulturen

1. Zentrifugieren der Kulturen bei etwa 100g (700 UpM) für 10 Minuten.
2. Überstand absaugen.
3. Auf 37° C erwärmtes Medium zupipettieren (5 ml je Kultur) und resuspendieren.
4. Wiederholung der Arbeitsschritte 1 bis 3.
5. Wiederholung der Arbeitsschritte 1 und 2 und Neuansatz der Kulturen.

2.10. Versuchsbedingungen und Abweichungen vom Kultivierungsschema bei den Experimenten zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen durch Zellteilungsstörungen, Mikrokernen und Polyploidien (Versuchsbezeichnungen sind im Versuchsplan erklärt)

- Der Kulturansatz erfolgte grundsätzlich mit HAM's F10.
- Die Kulturen wurden 40 Stunden nach Kulturansatz mit den Testsubstanzen behandelt
- In den Versuchen MI 4 und MI 5 wurde BUdR ab Kultivierungsbeginn zugegeben.
- Colcemid wurde in den Versuchen MI 1 bis MI 9 als positive Kontrolle für die Arretierung der Mitosen, Mikrokernbildung und Polyploidisierung verwendet. Die Negativkontrollen und mit den Testsubstanzen behandelte Kulturen wurden nicht mit Colcemid behandelt.
- Aufarbeitung mit isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl) statt mit hypotoner Kaliumchloridlösung zum Erhalten des Cytoplasmas bei der quantitativen Bestimmung von Mikrokernen (nur bei Versuch MI 3).
- Aufarbeitungszeitpunkt je nach Fragestellung zwischen 68 und 112 Stunden.

- Anfärbung der Präparate aus den Versuchen MI 1, MI 2 und MI 3 mit Giemsa-Normalfärbung.
- Von drei Präparaten aus jeder Kultur wurden in je 2 Präparaten die C-Banden und in je einem Präparat die Schwesterchromatiden differentiell angefärbt (Versuch MI 4 und MI 5).
- 2 Präparate von jeder Kultur wurden normal mit Giemsa gefärbt und je 1 Präparat wurde für die C-Bandenfärbung verwendet (Versuche MI 6 bis MI 9).

## 2.11. Versuchsaufbau und Versuchsplan

Alle Versuche zur Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen und zur Bestimmung der SCE-Raten wurden mit Parallelkulturen durchgeführt.

In allen Versuchen wurden unbehandelte Kontrollen (O-KO) und Lösungsmittelkontrollen (DMSO-Kontrolle: DMSO-KO, Ethanol-Kontrolle: ALK-KO) eingesetzt. Die Substanzen sind in DMSO gelöst, außer wenn der Vermerk (ALK) hinter dem Substanznamen auf die Lösung in Ethanol hinweist. Die Endkonzentration der Lösungsmittel betrug in allen Kulturen 1% des Gesamtvolumens.

In den Versuchen ohne metabolische Aktivierung diente Trenimon (TREN-KO) als Positivkontrolle. Cyclophosphamid (CP-KO) wurde in den Versuchen mit metabolischer Aktivierung als positive Referenz benutzt; in diesen Versuchen weist ein Minus- oder Pluszeichen darauf hin, ob die Kontrollen mit (+) S9-Mix behandelt worden sind oder nicht (-).

Beim Nachweis mitosearretierender und aneuploidisierender Wirkungen diente Colcemid als positive Referenzsubstanz (COLC-KO); Trenimon wurde eingesetzt, um Mikrokerne ohne heterochromatische Bereiche (abgeleitet von strukturellen Chromosomenaberrationen) ermitteln zu können.

### 2.11.1. Durchgeführte Versuche, aufgelistet nach den Experimentalansätzen

CA-: Versuche zur Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA- 1 bis CA- 7):  
Medium HAM's F10, keine BUdR-Zugabe, Substanzbehandlung ab 24 Stunden nach Kulturbeginn bis Kulturrende (Dauer: 24 Stunden), Kultivierungsdauer 48 Stunden.

- CA- 1: Blutspender D, männl.; 0-KO, DMSO-KO, ALK-KO  
TREN-KO :  $5 \times 10^{-8}$  M und  $1 \times 10^{-7}$  M  
MBC :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
DES (ALK) :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M
- CA- 2: Blutspender R, weibl.; 0-KO, ALK-KO  
TREN-KO :  $5 \times 10^{-8}$  M und  $1 \times 10^{-7}$  M  
Estradiol (ALK) :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
Progesteron (ALK) :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M
- CA- 3: Blutspender E, männl.; 0-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M;  $5 \times 10^{-8}$  M  
Testosteron :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M
- CA- 4: Blutspender T, weibl.; 0-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
Estron :  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M
- CA- 5: Blutspender G, männl.; 0-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
Androstanolon:  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M
- CA- 6: Blutspender L, weibl.; 0-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $2,5 \times 10^{-8}$  M;  $5 \times 10^{-8}$  M  
DES :  $10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M  
Estradiol :  $10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M  
Estron :  $10^{-4}$  M;  $5 \times 10^{-4}$  M  
Progesteron :  $10^{-4}$  M;  $5 \times 10^{-4}$  M
- CA- 7: Blutspender C, männl.; 0-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $2,5 \times 10^{-8}$  M;  $5 \times 10^{-8}$  M  
MBC :  $10^{-4}$  M;  $4 \times 10^{-4}$  M  
Testosteron :  $10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M  
Androstanolon:  $5 \times 10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M

SCE-: Versuche zur Ermittlung der SCE-Rate ohne metabolische Aktivierung (SCE- 1 bis SCE- 10).

Medium TC 199, BUdR-Zugabe bei Kulturbeginn, Substanzbehandlung ab 24 Stunden nach Kulturbeginn bis Kulturende (Dauer: 48 Stunden), Kultivierungsdauer 72 Stunden.

- SCE- 1: Blutspender K, weibl.; 0-KO, DMSO-KO, ALK-KO  
TREN-KO :  $0,5 \times 10^{-8}$  M;  $1 \times 10^{-8}$  M  
MBC :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
DES (ALK) :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M

- SCE- 2: Blutspender S, weibl.; O-KO, ALK-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $5 \times 10^{-8}$  M  
Estradiol (ALK) :  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
Testosteron (ALK):  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M
- SCE- 3: Blutspender P, weibl.; O-KO, ALK-KO  
TREN-KO :  $0,5 \times 10^{-8}$  M;  $1 \times 10^{-8}$  M  
Progesteron (ALK):  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M
- SCE- 4: Blutspender I, männl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
Androstanolon:  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M
- SCE- 5: Blutspender X, weibl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
Estron :  $10^{-9}$  M;  $10^{-8}$  M;  $10^{-7}$  M;  
 $10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
MBC :  $10^{-5}$  M;  $2,5 \times 10^{-5}$  M;  $5 \times 10^{-5}$  M;  
 $7,5 \times 10^{-5}$  M;  $1 \times 10^{-4}$  M
- SCE- 6: Blutspender D, männl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
DES :  $10^{-6}$  M;  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  
 $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M
- SCE- 7: Blutspender C, männl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $2,5 \times 10^{-8}$  M;  $5 \times 10^{-8}$  M  
MBC :  $10^{-4}$  M;  $4 \times 10^{-4}$  M  
Testosteron :  $10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M  
Androstanolon:  $5 \times 10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M
- SCE- 8: Blutspender L, weibl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $2,5 \times 10^{-8}$  M;  $5 \times 10^{-8}$  M  
DES :  $10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M  
Estradiol :  $10^{-4}$  M;  $10^{-3}$  M  
Estron :  $10^{-4}$  M;  $5 \times 10^{-4}$  M  
Progesteron :  $10^{-4}$  M;  $5 \times 10^{-4}$  M
- SCE- 9: Blutspender S, weibl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
DES :  $1 \times 10^{-5}$  M;  $2 \times 10^{-5}$  M;  
 $4 \times 10^{-5}$  M;  $8 \times 10^{-5}$  M
- SCE- 10: Blutspender D, männl.; O-KO, DMSO-KO  
TREN-KO :  $1 \times 10^{-8}$  M;  $2,5 \times 10^{-8}$  M  
DES :  $1 \times 10^{-5}$  M;  $2 \times 10^{-5}$  M  
 $4 \times 10^{-5}$  M;  $8 \times 10^{-5}$  M

CA+: Versuche zur Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen (und SCE-Raten) mit metabolischer Aktivierung bei direkter Zugabe von S9-Mix zu den Blutkulturen (CA+ 1 und CA+ 2):

Medium HAM's F10, BUDR-Zugabe, Aktivierung und Substanzbehandlung nach 46 Stunden, Kultivierungsdauer 70 Stunden (Vorkultivierungsphase 46 Stunden), Behandlungsdauer (S9-Mix und Substanzen) 1 Stunde. Auswaschen des S9-Mix, der Substanzen (und Metaboliten) nach 1 Stunde und Neuansatz mit BUDR. Dauer der Kultivierungsphase ab Behandlung 24 Stunden. S9-Mix: Konzentration 0,6 mg/ml (Proteinanteil im Kulturmedium), das entspricht 1,8% S9-Fraktion in der Kultur. S9-Fraktion Charge REL 093.

CA+ 1: Blutspender V, weibl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $1 \times 10^{-5}$  M  
MBC :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
DES :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Estron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Progesteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

CA+ 2: Blutspender U, weibl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $1 \times 10^{-5}$  M  
Estradiol :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Testosteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Androstanolon:  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

CA+ Dy: Versuche zur Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen (und SCE-Raten) mit metabolischer Aktivierung bei indirekter Applikation des S9-Mix zu den Blutkulturen mittels Dialyseschlauchs (CA+ Dy 1 und CA+ Dy 2):

Medium HAM's F10, Aktivierung und Substanzbehandlung nach 46 Stunden, Kultivierungsdauer 70 Stunden (Vorkultivierungsphase 46 Stunden), Behandlungsdauer (S9-Mix) 3 Stunden, der Substanzen (und Metaboliten) 6 Stunden, Auswaschen, und Neuansatz mit BUDR. Dauer der Kultivierungsphase ab Behandlung 24 Stunden.

S9-Mix: Konzentration 0,4 mg/ml  $\pm$  1,8% S9-Fraktion in der Kultur. S9-Fraktion Charge RFI 115.

CA+ Dy 1: Blutspender W, weibl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-5}$  M  
DES :  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Estradiol :  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Estron :  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Progesteron :  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

CA+ Dy 2: Blutspender A, männl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
 CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-5}$  M  
 MBC :  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
 Testosteron :  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
 Androstanolon:  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+: Versuche zur Ermittlung der SCE-Rate mit metabolischer Aktivierung bei direkter Zugabe von S9-Mix zu den Blutkulturen (SCE+ 1 bis SCE+ 3):

Medium TC 199, BUDr-Zugabe, Aktivierung und Substanzbehandlung nach 46 Stunden, Kultivierungsdauer 94 Stunden (Vorkultivierungsphase 46 Stunden), Behandlungsdauer (S9-Mix und Substanzen) 1 Stunde. Auswaschen des S9-Mix, der Substanzen (und Metaboliten) nach 1 Stunde und Neuansatz mit BUDr. Dauer der Kultivierungsphase ab Behandlung 48 Stunden.

S9-Mix: Konzentration 0,6 mg/ml  $\triangleq$  1,8% S9-Fraktion in der Kultur für Charge REL 093 und 2,0% für Charge REL 091.

SCE+ 1: S9-Fraktion Charge REL 093, 0,6 mg/ml  
 Blutspender L, weibl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
 CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M  
 MBC :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
 DES :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
 Progesteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ 2: S9-Fraktion Charge REL 093, 0,6 mg/ml  
 Blutspender B, männl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
 CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
 Estradiol :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
 Testosteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
 Androstanolon:  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ 3: S9-Fraktion Charge REL 091, 0,6 mg/ml  
 Blutspender Q, weibl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
 CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M  
 Estron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ Dy: Versuche zur Ermittlung der SCE-Rate mit metabolischer Aktivierung bei indirekter Applikation von S9-Mix zu den Blutkulturen im Dialyseschlauch (SCE+ Dy 1 und SCE+ Dy 2):

Medium TC 199, Aktivierung und Substanzbehandlung nach 46 Stunden, Kultivierungsdauer 94 Stunden (Vorkultivierungsphase 46 Stunden). Behandlungsdauer (S9-Mix) 3 Stunden, mit den Substanzen (und Metaboliten) 48 Stunden, kein Auswaschen bei SCE+ Dy 1. Sonst Auswaschen der Substanzen 24 Stunden nach

Behandlungsbeginn und Neuansatz mit BUDR. Dauer der Behandlung 24 Stunden (SCE+ Dy 2 bis SCE+ Dy 6). Dauer der Kultivierungsphase ab Behandlung 48 Stunden.

S9-Mix Charge REL 091: Konzentration 0,4 mg/ml  $\triangleq$  1,3% S9-Fraktion und 0,6 mg/ml  $\triangleq$  2,0% S9-Fraktion in der Kultur,  
Charge REL 093: Konzentration 0,6 mg/ml  $\triangleq$  1,8% S9-Fraktion in der Kultur,  
Charge RFC 032: Konzentration 0,6 mg/ml  $\triangleq$  1,7% S9-Fraktion in der Kultur,  
Charge RFI 115: Konzentration 0,4 mg/ml  $\triangleq$  1,9% S9-Fraktion und 0,6 mg/ml  $\triangleq$  2,9% S9-Fraktion in der Kultur.

SCE+ Dy 1: S9-Fraktion Charge REL 093, 0,6 mg/ml  
Blutspender L, weibl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M  
MBC :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
DES :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Progesteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ Dy 2: S9-Fraktion Charge REL 091, 0,6 mg/ml  
Blutspender R, weibl.; 0-KO, -/+ DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
DES :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Estradiol :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Estron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Progesteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ Dy 3: S9-Fraktion Charge RFI 115, 0,4 mg/ml  
Blutspender R, weibl.; DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
DES :  $10^{-4}$  M  
Estradiol :  $10^{-4}$  M  
Estron :  $10^{-4}$  M  
Progesteron :  $10^{-5}$  M;  $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ Dy 4: S9-Fraktion Charge RFC 032, 0,6 mg/ml  
Blutspender H, männl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M  
MBC :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Testosteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Androstanolon:  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ Dy 5: S9-Fraktion Charge REL 091, 0,6 mg/ml  
Blutspender D, männl.; 0-KO -/+, DMSO-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M;  
Testosteron :  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M  
Androstanolon:  $10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M

SCE+ Dy 6: S9-Fraktion Charge REL 091, 0,4 und 0,6 mg/ml  
S9-Fraktion Charge RFI 115, 0,4 und 0,6 mg/ml  
Blutspender D, männl.; 0-KO -/+  
CP-KO -/+ :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $1 \times 10^{-5}$  M;  
                   $5 \times 10^{-5}$  M

MI: Versuche zum Nachweis von Zellteilungsstörungen, Mikrokernen und Polyploidien als Indikatoren für die Eigenschaft von Substanzen, numerische Chromosomenaberrationen in Humanlymphozyten in vitro zu induzieren:

Medium HAM's F10, Kultivierungsdauer vor Behandlungsphase 40 bis 44 Stunden plus variable Dauer der Behandlungsphase, keine Colcemidzugabe (Colcemid als positive Kontrolle), keine metabolische Aktivierung.

MI 1 und MI 2: Mitosearretierende Wirkung von MBC (MI 1) und von allen 7 Testsubstanzen (MBC, DES und Steroide (MI 2)). Substanzzugabe nach 44 Stunden bis zur Aufarbeitung nach 48 Stunden.

MI 1: Blutspender O, weibl.; 0-KO, DMSO-KO  
COLC-KO :  $2,2 \times 10^{-7}$  M  
MBC :  $5 \times 10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  
       $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  
       $5 \times 10^{-5}$  M;  $10^{-4}$  M;  
       $4 \times 10^{-4}$  M

MI 2: Blutspender M, weibl.; 0-KO, DMSO-KO  
COLC-KO :  $0,2 \times 10^{-7}$  M;  $0,5 \times 10^{-7}$  M  
           $1,1 \times 10^{-7}$  M;  $2,2 \times 10^{-7}$  M  
MBC, DES, Estradiol, Estron, Progesteron,  
Testosteron und Androstanolon: je  $10^{-4}$  M

MI 3: Metaphasearretierung und Mikrokerne in Interphasezellen, Substanzzugabe nach 40 Stunden, Aufarbeitung nach 68 Stunden (Behandlungsdauer 28 Stunden) mit isotoner Kochsalzlösung (0,9% NaCl) statt hypotonem Schock.

MI 3: Blutspender Q, weibl.; 0-KO, DMSO-KO  
COLC-KO :  $1,1 \times 10^{-8}$  M;  $2,2 \times 10^{-8}$  M  
MBC :  $5 \times 10^{-7}$  M;  $10^{-6}$  M;  
       $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $5 \times 10^{-5}$  M  
DES :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $5 \times 10^{-5}$  M  
       $1 \times 10^{-4}$  M  
Estradiol :  $5 \times 10^{-6}$  M;  $10^{-5}$  M;  $5 \times 10^{-5}$  M  
           $1 \times 10^{-4}$  M

MI 4 und MI 5: Metaphasearretierung, Nachweis von Mikroker-  
nen in Interphasezellen, Darstellung von C-Banden in Meta-  
phasechromosomen und von heterochromatischen Bereichen in  
Hauptkernen und Mikrokernen von Interphasezellen. Nachweis  
von Polyploidien in Abhängigkeit zum Proliferationsverhalten  
(Ploidiegrad in 1., 2. und 3. Mitosen nach Kulturbeginn).  
Medium HAM's F10, BUdR-Zugabe bei Kulturbeginn, Substanzbe-  
handlung nach 40 Stunden bis zur Aufarbeitung. Aufarbeitung  
nach 70 Stunden (MI 4) und nach 90 Stunden (MI 5). Dauer der  
Substanzbehandlung 30 Stunden bei MI 4 und 50 Stunden bei  
MI 5.

MI 4 und

|           |                                              |  |
|-----------|----------------------------------------------|--|
| MI 5:     | Blutspender N, weibl.; 0-KO, DMSO-KO         |  |
| TREN-KO   | : $1 \times 10^{-7}$ M; $5 \times 10^{-7}$ M |  |
| COLC-KO   | : $1 \times 10^{-7}$ M; $2 \times 10^{-7}$ M |  |
| MBC       | : $1 \times 10^{-5}$ M; $5 \times 10^{-5}$ M |  |
|           | $1 \times 10^{-4}$ M                         |  |
| DES       | : $1 \times 10^{-5}$ M; $5 \times 10^{-5}$ M |  |
|           | $1 \times 10^{-4}$ M                         |  |
| Estradiol | : $1 \times 10^{-5}$ M; $5 \times 10^{-5}$ M |  |
|           | $1 \times 10^{-4}$ M                         |  |

MI 6 bis MI 9: Metaphasearretierung und Nachweis polyploider  
Metaphasen.

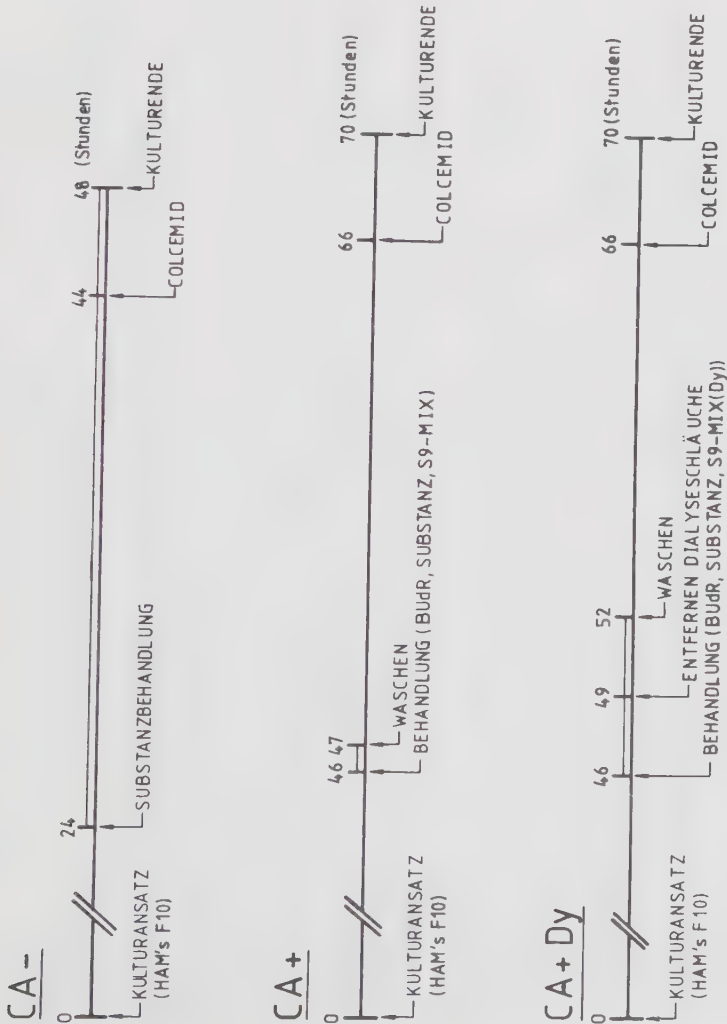
Medium HAMS' F10, Substanzbehandlung nach 40 Stunden, Aufar-  
beitung nach 72 Stunden (MI 6), 84 Stunden (MI 7), 96 Stun-  
den (MI 8) und 112 Stunden (MI 9). Dauer der Substanzbehand-  
lung 32 Stunden bei MI 6, 44 Stunden bei MI 7, 56 Stunden  
bei MI 8 und 72 Stunden bei MI 9.

MI 6 bis

|           |                                              |  |
|-----------|----------------------------------------------|--|
| MI 9:     | Blutspender R, weibl.; 0-KO, DMSO-KO         |  |
| COLC-KO   | : $1 \times 10^{-7}$ M; $2 \times 10^{-7}$ M |  |
| MBC       | : $1 \times 10^{-5}$ M; $5 \times 10^{-5}$ M |  |
| DES       | : $5 \times 10^{-5}$ M; $1 \times 10^{-4}$ M |  |
| Estradiol | : $5 \times 10^{-5}$ M; $1 \times 10^{-4}$ M |  |

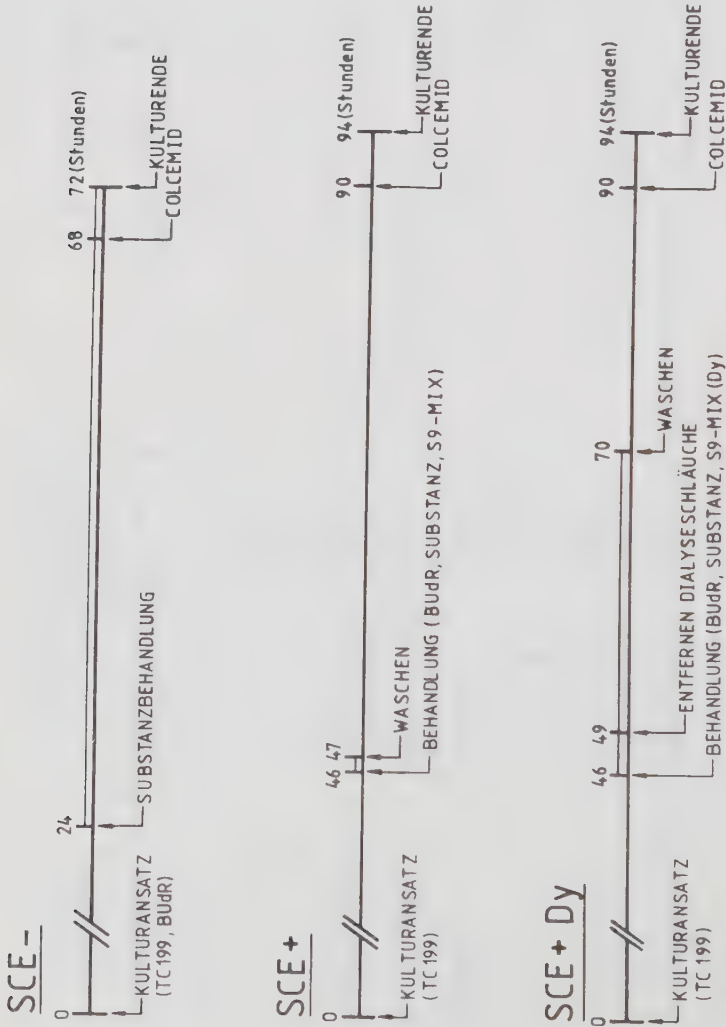
## 2.11.2. Übersicht Versuchsplan

Versuche zur Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen ohne Aktivierung (CA-), mit direkter Zugabe von S9-Mix (CA+) und Zugabe von S9-Mix im Dialyseschlauch (CA+ Dy):



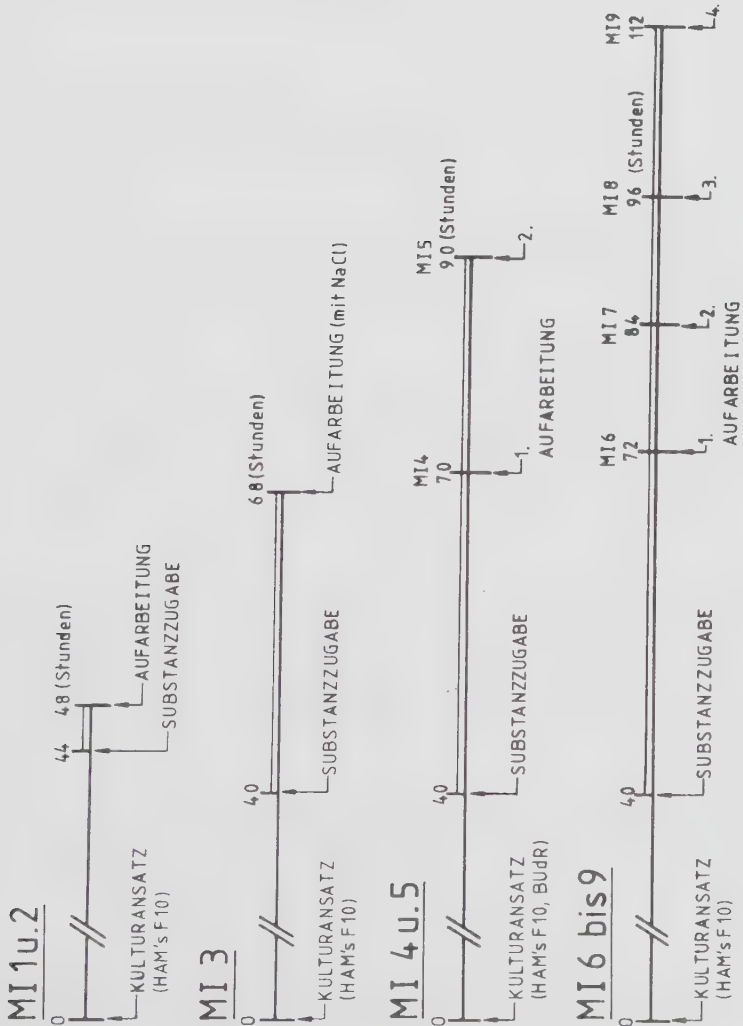
Fortsetzung: Übersicht Versuchsplan

Versuche zur Bestimmung der SCE-Raten, ohne Aktivierung (SCE-), mit direkter Zugabe von S9-Mix (SCE+) und Zugabe von S9-Mix im Dialyseschlauch (SCE+ Dy):



Fortsetzung: Übersicht Versuchsplan

Versuche zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen:



## 2.12. Statistische Analyse

Die Ergebnisse der Auswertungen hinsichtlich struktureller Chromosomenaberrationen wurden im zweiseitigen Dunnett-Test (DUNNETT, 1955, 1964) und im  $\chi^2$ -Test (FLEISS, 1979) auf einem Signifikanzniveau von 95% ( $p = 0,05$ ) verglichen.

Als Meßwerte für die statistische Analyse wurden die Anteile aberranter Metaphasen (ohne achromatische Läsionen) in % der ausgewerteten Metaphasen verwendet.

Die Werte der unbehandelten Kontrollen, Lösungsmittelkontrollen und Positivkontrollen aus gleichartigen Experimentalserien wurden untereinander zusammengefaßt und im Dunnett-Test analysiert. Prozentangaben unterliegen nicht der Normalverteilung, die eine Voraussetzung der statistischen Analyse im Dunnett-Test ist. Deshalb wurden die Einzelwerte mit  $\arcsin\sqrt{x}$  transformiert, um eine Varianzhomogenität (Normalverteilung) herzustellen. Die Berechnung ergibt, ob zwischen den aus verschiedenen Spendern zusammengefaßten Kontrollgruppen signifikante Unterschiede bestehen.

Im  $\chi^2$ -Test wurden die Einzelwerte der getesteten Substanzen gegen die Einzelwerte der Lösungsmittelkontrollen verglichen. In den Versuchen mit S9-Mix wurde die Lösungsmittelkontrolle mit S9-Mix als Vergleichswert verwendet.

Der  $\chi^2$ -Test ist für Erwartungswerte  $< 5$  nur von begrenzter Aussagekraft. Ergaben sich in solchen Fällen signifikante Unterschiede im Bereich des Signifikanzniveaus, wurden diese Ergebnisse als nicht signifikant interpretiert.

Die Ergebnisse der SCE-Auswertungen wurden im zweiseitigen Dunnett-Test für Mittelwerte (mit Standardabweichungen) auf einem Signifikanzniveau von  $p = 0.05$  statistisch analysiert. Es wurden alle Ergebnisse innerhalb der Experimentalserien untereinander gegen die Lösungsmittelkontrolle verglichen. Als Meßgröße wurde die mittlere SCE-Rate in  $n$  Zellen verwendet.

Der Dunnett-Test ist ein parametrischer Test für multiple Vergleiche, bei dem in die statistische Berechnung die Werte aller Gruppen einer Experimentalserie eingehen. Bei nur zwei Gruppen (Kontroll- und Testgruppe) entspricht der Dunnett-Test dem  $t$ -Test. Der  $t$ -Test nach Student ist das bisher übliche statistische Verfahren, das zur Berechnung von Signifikanzen in SCE-Analysen verwendet worden ist.

Für die Versuche zum indirekten Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen in Mikrokernen wurden keine statistischen Analysen vorgenommen.

### 3. ERGEBNISSE

Die Ergebnisse sind wie folgt gegliedert:

Im ersten Teil sind die Kriterien für die Auswertung der strukturellen Chromosomenaberrationen, der SCE-Raten und die Kriterien zum Nachweis von Zellteilungsstörungen und numerischen Chromosomenaberrationen beschrieben.

Danach folgen die Ergebnisse der Kontrollen und der getesteten Substanzen, gegliedert nach

- strukturellen Chromosomenaberrationen  
und
- SCE-Raten

in der Reihenfolge: MBC, DES, Estradiol, Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon (soweit sie nicht aufgrund der Gleichartigkeit der Ergebnisse zusammengefaßt sind).

Im letzten Teil des Kapitels sind die Ergebnisse der Versuche zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen beschrieben.

Die Ergebnistabellen und Abbildungen sind im Anhang dieser Arbeit zusammengestellt. Die Tabellen sind wie folgt geordnet:

- Zusammenfassung der in den einzelnen Experimentalserien verwendeten Kontrollen
- Strukturelle Chromosomenaberrationen und SCEs ohne und mit metabolischer Aktivierung, zusammengefaßt nach den Testsubstanzen (Reihenfolge der Substanzen wie oben)
- Tabellen zu den Versuchen zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen in Lymphozytenkulturen

#### 3.1 Kriterien bei der Auswertung der Versuche zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen und zur Bestimmung der Rate von Schwesterchromatidenaustauschen (SCE)

##### 3.1.1. Strukturelle Chromosomenaberrationen

In Giemsa-normalgefärbten Präparaten (48-Stunden Kulturen mit HAM's F10 (CA-)) und in Präparaten mit differentieller Schwesterchromatidenanfärbung (46 + 24-Stunden Präparate mit

HAM's F10 (CA+ und CA+ Dy)) wurden strukturelle Aberrationen der Chromosomen ausgewertet. Ausgewertet wurden Metaphaseplatten mit 44 bis 46 Chromosomen.

Es wurden jeweils Parallelkulturen angesetzt und nach der Beurteilung der Präparatequalität (Zelldichte, Spreitungsqualität, Anfärbung) wurde ein Präparat pro Substanz und Konzentration ausgewählt, und codiert ausgewertet. Nach Möglichkeit wurden 100 Mitosen ausgewertet. Konnten aus einem Präparat nicht genügend Metaphasen ausgewertet werden, wurden die Präparate aus der gleichen Kultur in die Auswertung der nächsten Experimentalserie mit einbezogen und codiert mitausgewertet.

Strukturelle Veränderungen der Chromosomen werden unter dem Begriff chromosomale Aberrationen zusammengefaßt.

Aberrationen vom Chromatidentyp:

Achromatische Läsionen oder Gaps (AL) sind ungefärbte Bereiche in den Chromatiden ohne Dislokation chromatidalen Materials. Die genetische Bedeutung der AL ist unklar. Alle anderen Aberrationstypen lassen sich auf Bruchereignisse in den Chromosomen zurückführen und sind somit echte Mutationen (Chromosomenmutationen).

Chromatidbrüche (B') sind der morphologische Ausdruck eines Bruchs in der DNS einer Chromatide. Zum Bewertungskriterium eines Bruches gehört neben der Diskontinuität in der Färbung einer Chromatide die Dislokation des abgebrochenen Chromatidenstücks. Isochromatidbrüche (B'') sind Brüche in der gleichen Region zweier Chromatiden eines Chromosoms. B'' sind nicht von Chromosomenbrüchen unterscheidbar. Chromatidtranslokationen (RB') sind das Ergebnis von Brüchen in Chromatiden verschiedener Chromosomen, deren Bruchenden reziprok miteinander verheilen und in der folgenden Metaphase eine Austauschfigur bilden. RB'B'' sind seltene Translokationsfiguren, bei denen die offenen Enden reziprok miteinander verheilen, die durch einen Doppelbruch und einem Chromatidbruch entstanden sind. Als Austauschfigur bilden sie in der Metaphase eine dreiarmlige Chromosomenkonfiguration (Triradial).

Aberrationen vom Chromosomentyp:

Dizentrische Chromosomen (Dic) sind das Ergebnis einer wechselseitigen Verheilung der Bruchenden zweier zentrischer Bruchelemente von Chromosomen. Es entsteht ein Chromosom mit zwei Zentromeren und ein (selten zwei) azentrisches Fragment.

Ringchromosomen (Ringe) entstehen durch die Verheilung zweier Brüche innerhalb eines Chromosoms. Je nachdem, ob das Zentromer mit in den Ring einbezogen ist oder nicht, spricht

man von zentrischen oder azentrischen Ringen.

AL, B' und B'' werden auch als offene chromatidale Aberrationen bezeichnet, BB', DBC, und Ring sind Austauschaberrationen („exchanges“: Exch.).

### 3.1.2. Schwesterchromatidenaustausche (SCE)

Durch das im Methodenteil beschriebene Verfahren der Lymphozytenkultivierung in Gegenwart von BUdP und der anschließender Fluoreszenz plus Giemsa-Färbetechnik erhält man in 2. Mitosen nach BUdP-Einbau Chromosomen mit differentieller Färbung der Schwesterchromatiden. Diese Methodik erlaubt die Analyse wechselseitiger Austausche zwischen den Schwesterchromatiden eines Chromosoms (SCE).

Schwesterchromatidenaustausche im Zentromerbereich wurden zur Ermittlung der SCE-Rate mitgewertet. Waren die Chromatiden im Zentromerbereich verdreht, wurde das nicht als SCE gewertet. Es wurden nur Mitosen mit 46 Chromosomen berücksichtigt. War die Auswertung tetraploider Metaphasen erforderlich, wurden die Werte auf den diploiden Chromosomensatz umgerechnet.

Zur Bestimmung der SCE-Raten wurden nach Möglichkeit 25 Metaphasen pro Konzentration ausgewertet. Die Präparate wurden nach den gleichen Kriterien wie bei der Chromosomenanalyse und nach der Qualität der differentiellen Färbung ausgewählt und ebenfalls codiert ausgewertet. Wurden nach der Entschlüsselung geringe Erhöhungen über die Spontankraten registriert, so wurden Präparate aus den Parallelkulturen ebenfalls codiert und mit der nächsten Experimentalserie zusammen analysiert.

SCE treten mit einer für den Karyotyp einer Spezies, einer Zelllinie oder eines Individuums typischen Häufigkeit spontan auf. Eine Erhöhung der SCE-Raten über die Spontankrate ist ein Indikator für die mögliche mutagene Wirkung einer Substanz. Mutagene, die S-Phase abhängige Schädigungen an den Chromosomen induzieren wie alkylierende Agenzien und UV-Strahlung führen auch zu einer Erhöhung der SCE-Frequenzen. S-Phase unabhängig wirkende Mutagene wie ionisierende Strahlung und Bleomycin induzieren dagegen keine oder nur geringe Steigerungen der SCE-Raten (CORBARN, 1981; PERRY und EVANS, 1975; WOLFF, 1977).

### 3.1.3. Zusätzliche Parameter bei der Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen und der SCE-Raten

In allen Präparaten wurde der Mitoseindex bestimmt. Der Mitoseindex gibt in Prozent an, welcher Anteil der Zellen sich

in der Mitose befindet. Zur Bestimmung des Mitoseindex wurden im ersten Drittel des Objektträgers vom Mattschliff aus gesehen die Anzahl der Mitosen pro 1000 transformierte Kerne gezählt.

In differentiell angefärbten Präparaten wurde das Proliferationsverhalten der Zellpopulation mittels der Auswertung der Anteile 1., 2. und 3. Mitosen bestimmt, hierbei wurden je 100 Mitosen analysiert.

Morphologische Veränderungen, die offenbar auf zytotoxischen Einflüssen auf die Lymphozyten beruhen, wurden bei der Beschreibung der Ergebnisse mit berücksichtigt. Hierzu gehören: Reduzierte Mitoseindices, pyknotische Zellkerne und Metaphasechromosomen, die sehr schlecht gespreitet sind. In solchen Mitosen ist eine zytogenetische Analyse nur noch bedingt oder nicht mehr durchführbar.

Numerisch aberrante Metaphasen wurden bei der Auswertung von strukturellen Chromosomenaberrationen und SCE-Raten nicht quantitativ bestimmt, sie können leicht bei der Aufarbeitung entstehen und können somit nicht als "echte" Aneuploidien angesehen werden. Polyploide und endoreduplizierte Metaphasen wurden protokolliert.

### 3.2. Kriterien bei der Auswertung numerischer Chromosomenaberrationen

In den Versuchen zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen wurden Mitoseindices, der Ploidiegrad, die Mikrokernrate, der Anteil an C-Banden in Metaphasechromosomen und der Anteil an Chromozentren in Interphase- und Mikrokernen bestimmt.

#### 3.2.1. Bestimmung der Mitoseindices

Die Bestimmung der Mitoseindices zum Nachweis metaphasearretierender Wirkungen von Substanzen wurden nach den gleichen Kriterien vorgenommen wie in den Versuchen zum Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen und erhöhter SCE-Raten. Weil die Mitosen innerhalb eines Präparates sehr ungleichmäßig verteilt sein können und der Mitoseindex in der Auswertung großen Abweichungen unterliegen kann, wurden in diesen Versuchen größere Stichprobenumfänge verwendet. So wurden im Versuch MI 1 je 1000 transformierte Kerne aus 2 Präparaten von 2 Parallelkulturen ausgewertet (insgesamt 4000 Zellkerne pro Punkt). Im Versuch MI 2 wurden die Mitoseindices aus je 1000 Zellkernen von 2 Präparaten pro Punkt ermittelt. In den anderen Versuchen, in denen der Mitoseindex nur als zusätzliche Meßgröße diente, wurden je 1000 transformierte Kerne ausgezählt.

### 3.2.2. Auswertung von Mikrokernen in Interphasen von Lymphozyten

Mikrokerne enthalten Chromatin, das nicht im Hauptkern integriert ist, sondern getrennt vom Hauptkern mit einer Kernmembran umgeben im Zytoplasma liegt. Mikrokerne werden in der Telophase der Mitose oder Meiose gebildet. Die Entstehungsweise kann auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruhen.

(1) Mikrokerne können von strukturellen Chromosomenaberrationen abgeleitet werden. Zentromerlose Chromosomenteile können in der Äquatorialebene der Zelle liegenbleiben (lagging chromatin) und sich mit einer eigenen Kernmembran umgeben (Mikrokerne, abgeleitet von strukturellen Chromosomenaberrationen).

(2) Ganze Chromosomen bleiben in der Äquatorialebene zurück und umgeben sich mit einer eigenen Kernmembran. Dieses Phänomen (non-disgression, non-disjunction) beruht auf Funktionsstörungen des Spindelapparates. Bei vollständigem Ausbleiben der Bildung eines Spindelapparates entstehen polyploide Zellen.

Morphologisch unterscheiden sich Mikrokerne, die nach Mechanismus (1) oder (2) entstanden sind, nicht. Allerdings läßt sich durch die Bildung relativ großer Mikrokerne, durch sichtbare Chromozentren in Mikrokernen, oder durch Anfärbung des Spindelapparats in der Anaphase ein Hinweis über den Entstehungsmechanismus der Mikrokernen gewinnen.

Die Auswertung von Mikrokernen in Zellkulturen unterscheidet sich von der Auswertung der Mikrokerne in blutbildenden Zellen des Knochenmarks; (nach in vivo-Behandlung mit Mikrokern-induzierenden Substanzen beim Säuger). Beim Knochenmarkstest sind hinsichtlich der Bildung von Mikrokernen die erythropoetischen Stammzellen betroffen, die im Verlauf der Erythropoese den Hauptkern ausstoßen. Die Erythrozyten sind kernlos. Bei der Bildung von Mikrokernen wird der Mikrokern nicht mit dem Hauptkern ausgestoßen, sondern verbleibt in der Zelle. In den (jungen) polychromatischen Erythrozyten sind in diesem Falle nur die Mikrokerne im Zytoplasma der Zelle verblieben und leicht nachweisbar.

In Zellkulturen treten die Mikrokerne hingegen als zusätzliche Kerne neben dem Hauptkern auf und sind im Zytoplasma in der Umgebung der Hauptkerne aufzufinden. Zur Erhaltung des Zytoplasmas ist eine abgeänderte Aufarbeitung nötig. Statt der hypotonen Behandlung mit 0,075 M KCl-Lösung erfolgt die Aufarbeitung mit isotoner NaCl-Lösung.

Im Versuch MI 3 wurden 2 Auswertungen nach unterschiedlichen Kriterien durchgeführt. In der ersten Auswertung wurden die

Kerne aller transformierten Lymphozyten gezählt, unabhängig davon, ob das Zytoplasma deutlich ausgeprägt war, schwach sichtbar war oder fehlte. In der zweiten Auswertung wurden nur transformierte Lymphozyten mit deutlich sichtbarem Zytoplasma gewertet.

Bei mehreren Mikrokernen in einer Zelle war die Zuordnung zum Hauptkern dann nicht möglich, wenn die Plasmasäume mehrerer beieinander liegender Kerne nicht voneinander getrennt wahrgenommen werden konnten. In solchen Fällen erfolgte die Zuordnung der Mikrokerne zu den Hauptkernen willkürlich. Einen entscheidenden Einfluß auf die Ergebnisse hat dieses Vorgehen nicht. Bei relativ geringen Mikrokernraten ist das Auftreten mehrerer Mikrokerne in einem Plasmaareal sehr selten, nur bei sehr hohen Mikrokernraten wurden gehäuft mehrere Mikrokerne in einer Zelle gefunden. Die willkürliche Zuordnung zu einem oder mehreren Hauptkernen kann dabei zu Fehlern in der Anzahl von Zellen mit Mikrokernen führen; beeinflusst aber nicht die Gesamtzahl der gefundenen Mikrokerne.

### 3.2.3. Auswertung von Zentromerregionen (C-Banden)

In den Präparaten, die nach einer modifizierten C-Bandenfärbung nach SUMNER (1972) angefärbt wurden, wurde die Anzahl der erkennbar differenzierten Zentromerregionen von Metaphasechromosomen pro Mitose bestimmt. Die Anzahl der erkennbaren C-Banden pro Metaphase wurde aus einer Auswahl von verschiedenen Präparaten ermittelt (10 Metaphasen pro Präparat), um sicherzugehen, daß die Substanzbehandlung keinen Einfluß auf die Anfärbung des zentromernahen Heterochromatins hat. Die Häufigkeiten der C-Banden pro Mitose wurden verglichen mit der Anzahl der heterochromatischen Bereiche in Interphasekernen aus den gleichen Präparaten und aus Präparaten, die keiner C-Bandenfärbung ausgesetzt waren. Diese heterochromatischen Bereiche, die dunkler angefärbt sind, sind vermutlich Chromozentren.

### 3.2.4. Auswertung von heterochromatischen Bereichen in Mikrokernen

In C-Banden-gefärbten Präparaten wurden die Mikrokerne dahingehend untersucht, ob in ihnen heterochromatische Bereiche sichtbar werden. Solche Chromozentren sind überwiegend nur in Mikrokernen zu erwarten, die durch ganze Chromosomen gebildet werden.

### 3.2.5. Anzahl polyploider Metaphasen in 1., 2. und 3. in vitro Mitosen

In differentiell angefärbten und in Giemsa-Normal-gefärbten Präparaten wurde der Anteil polyploider Metaphasen bestimmt. Als tetraploid wurde jede Mitose gewertet, die etwa 92 Chromosomen enthielt. Eine exakte Bestimmung der Chromosomenzahl ist zur Erkennung einer Polyploidie nicht nötig und oft auch nicht möglich und wurde nicht durchgeführt. Metaphasen mit mehr als 80 Chromosomen und weniger als 100 wurden als tetraploid gewertet. Als oktaploide Metaphasen ( $8N = 184$ ) wurden Mitosen mit Chromosomenzahlen zwischen 160 und 200 gewertet. Als weiteres Kriterium für die Polyploidie galten ein annähernd gleicher Kondensationsgrad der Chromosomen und eine gemeinsame Metaphaseplatte.

### 3.3. Ergebnisse der Auswertung von strukturellen Chromosomenaberrationen

#### 3.3.1 Negativkontrollen

In jeder Experimentalserie wurden als Negativkontrollen unbehandelte Kontrollen (O-KO, Tabelle 6 und 8), Lösungsmittelkontrollen, (ALK-KO, DMSO-KO, Tabelle 6 und 8) und in den Versuchen mit Aktivierungssystem Cyclophosphamid ohne S9-Mix (CP-KO-, Tabelle 9) angelegt.

Als Positivkontrollen dienten Trenimon (TREN-KO) und Cyclophosphamid mit S9-Mix (CP-KO +; siehe Punkt 3.3.2.).

In den Negativkontrollen sind die Raten der strukturellen Chromosomenaberrationen niedrig (Tabellen 6, 8 und 9). AL treten mit einer Häufigkeit von 0 - 4 pro 100 Metaphasen auf, B' mit 0 - 5 pro 100 und B'' mit 0 - 2 pro 100. Bezogen auf die Gesamtzahl chromosomaler Aberrationen (ohne AL) sind 0 - 5 Aberrationen in 100 Metaphasen nachweisbar.

In den O-KO der Spender D, männl.; L und U, weibl. traten Austauschaberrationen (Exch.) des Chromatidentyps (RB') und Chromosomentyps (Dic) auf. Die Häufigkeit der Austauschaberrationen in den Negativkontrollen beträgt 5 Exch. in 3100 ausgewerteten Metaphasen ( $\triangleq 16,13 \times 10^{-4}$ )

Bei längerer Kultivierungsdauer (Vorkultivierungsphase von 46 Stunden, Behandlung und nachfolgender Kultivierung von 24 bis 48 Stunden treten vereinzelt endoreduplizierte Metaphasen und tetraploide Zellen auf. Im Versuch CA+ Dy 1 waren in Negativkontrollen vereinzelt Zellen mit multipler Fragmentierung zu beobachten (als multipel fragmentiert wurden Zel-

len gewertet, in denen mehr als 5 Brüche und Doppelbrüche in einer Metaphase auftraten). Im Versuch CA+ Dy 2 fanden sich in den Negativkontrollen Zellen mit bis zu 3 Doppelbrüchen. Es kann nicht entschieden werden, ob diese aberranten Metaphasen spenderbedingt, oder durch die Art der Kultivierung verursacht sind.

### 3.3.2. Positivkontrollen

Positivkontrollen mit Trenimon (Tabelle 7) und Cyclophosphamid (Tabelle 9) führen zu erhöhten Raten struktureller Chromosomenaberrationen. Konzentrationsbedingt erhöht sich die Rate der AL auf 2 - 8, der B' auf 4 - 18 und der B'' auf 1 - 9. Die Gesamtzahl der Aberrationen ohne AL pro 100 Metaphasen liegt zwischen 7 und 24.

Austauschaberrationen sind in den Versuchen CA- 2, 3, 5 und 7 und CA+ 1 nur in den Positivkontrollen zu finden. In CA- 6 ist die Rate der Austauschaberrationen von 1 in 200 Metaphasen in der Nullkontrolle auf 4 in 200 Metaphasen erhöht. Alle Ergebnisse der Positivkontrollen sind nach der statistischen Analyse im  $\chi^2$ -Test für die Einzelwerte und im Dunnett-Test für die zusammengefaßten Werte innerhalb einer Konzentration signifikant gegenüber den O-KO erhöht ( $p < 0,05$ ).

### 3.3.3. Testsubstanzen

Alle 7 Testsubstanzen: MBC (Tabelle 17 und 18), DES (Tabelle 22 und 23), Estradiol (Tabelle 28 und 29), Estron (Tabelle 33 und 34), Progesteron (Tabelle 38 und 39), Testosteron (Tabelle 43 und 44) und Androstanolon (Tabelle 48 und 49) ergaben sowohl ohne als auch mit Aktivierung keine abweichenden Werte von den Negativkontrollen, sie liegen für alle Aberrationstypen und für die Gesamtheit der Aberrationen (ohne AL) in der Bandbreite der Negativkontrollen. Die statistische Analyse für die Einzelwerte nach Substanzbehandlung im  $\chi^2$ -Test zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den Einzelwerten der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen (Signifikanzniveau  $p = 0,05$ ).

Auch in Bezug auf Austauschaberrationen ist keine höhere Rate als in den Negativkontrollen nachzuweisen. Insgesamt wurden 2 Exch. (1 Dic, 1 RB') in MBC-behandelten Kulturen ohne metabolische Aktivierung (CA- 1) gefunden, (1 RB' bei  $1 \times 10^{-8}$  M und 1 Dic bei  $1 \times 10^{-5}$  M). In diesem Versuch wurde auch in der O-KO eine Austauschaberration nachgewiesen, so daß davon ausgegangen werden kann, daß diese Austauschaberrationen kein Substanzeffekt sind, sondern zu den bei

diesem Spender spontan auftretenden Aberrationen zu zählen sind.

Das Gleiche gilt für Estradiol, wo in den Versuchen CA- 6 ein Dic ( $1 \times 10^{-4}$  M), in CA+ 2 ein RB' ( $1 \times 10^{-4}$  M) und in CA+ Dy 1 ein Dic ( $1 \times 10^{-4}$  M) festgestellt wurden. In diesen Versuchen waren in den Negativkontrollen ebenfalls Austauschaberrationen nachweisbar.

In den mit Androstanolon behandelten Kulturen wurde ebenfalls eine Austauschaberration gefunden (RB'B'' bei  $1 \times 10^{-4}$  M), wobei auch in der Lösungsmittelkontrolle eine Austauschaberration nachweisbar war.

Bezogen auf die Gesamtheit aller ausgewerteten Metaphasen mit Substanzbehandlung beträgt die Exchangerate 8,6 Exch. in  $10^4$  Metaphasen, was unter der Exchangerate der Negativkontrollen liegt.

Für zytotoxische Wirkungen werden im allgemeinen die Reduktion des Mitoseindex und morphologische Veränderungen der Zellen herangezogen, wie zum Beispiel eine Pyknose des Zellkerns. Der reduzierte Mitoseindex von Trenimon ab  $1 \times 10^{-7}$  M ist allerdings einer Zellzyklusverzögerung zuzuschreiben, wie sie für höhere Konzentrationen Trenimon bekannt ist.

MBC führt nicht zu einer drastischen Senkung des Mitoseindex, es sind aber in Konzentrationen ab  $1 \times 10^{-4}$  M Pyknoten der Zellkerne, starke Chromatidenkondensation in der Metaphase, ein gehäuftes Auftreten aneuploider Metaphasen einhergehend mit einer Verstreuung einzelner oder kleiner Gruppen von Chromosomen über das Präparat zu beobachten. Zudem findet man Metaphasen, bei denen die Schwesterchromatiden nicht mehr gepaart vorliegen, sondern ungeordnet in der Metaphase verteilt sind (C-Anaphasen). Diese Effekte sind durch andere Mechanismen als zytotoxische Einflüsse zu erklären. Auf sie wird noch im Detail eingegangen. Zytotoxische Effekte sind für MBC im getesteten Konzentrationsbereich in diesem System nicht nachgewiesen worden.

Bei den Hormonen ist in den Versuchen ohne S9-Mix immer ein deutliches Absinken des Mitoseindex im Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^{-4}$  bis  $1 \times 10^{-3}$  M (mit Ausnahme von Estron) festzustellen, also fast immer im Bereich der Löslichkeitsgrenze in DMSO. Im Bereich um  $5 \times 10^{-4}$  M /  $1 \times 10^{-3}$  M setzt während der Kultivierung nach Behandlung mit den Substanzen eine Hämolysse des Blutes ein.

#### Sonstige Beobachtungen:

In den Versuchen mit einer Vorkultivierung von 46 Stunden und nachfolgender Kultivierungsphase von 24 Stunden (CA+ und

CA+ Dy) treten unabhängig von der Art der Substanzbehandlung vereinzelt tetraploide Zellen und Endoreduplikationen auf. Diese Effekte können den Kultivierungsbedingungen zugerechnet werden, weil diese Effekte mit der Kulturdauer (besonders in den Versuchen SCE+ Dy, Kulturdauer 46 + 48 Stunden) gehäuft auftreten.

Erhöhte Raten von Aneuploidien/Tetraploidien liegen nach der Behandlung mit MBC oder DES in hohen Konzentrationen ( $1 \times 10^{-4}$  M) vor.

#### 3.4. SCE-Raten in Versuchen ohne und mit metabolischer Aktivierung

In den Versuchen mit metabolischer Aktivierung zur Auswertung der strukturellen Chromosomenaberrationen (CA+ und CA+ Dy) wurde zum Behandlungsbeginn BUdR zugegeben, um bei der Auswertung erste von zweiten Mitosen unterscheiden zu können. Mitosen, die vom Beginn der Behandlung nur eine S-Phase durchlaufen hatten, wurden als „1. Mitosen“ auf strukturelle Chromosomenaberrationen ausgewertet.

In den 24 Stunden zwischen Behandlung und Aufarbeitung hatte ein Teil der Zellen schon zwei S-Phasen durchlaufen (Tabelle 12). In diesen Präparaten konnten deshalb auch die SCE-Raten bestimmt werden. Dabei war auffällig, daß die SCE-Raten in den Negativkontrollen mit HAM's F10 signifikant niedriger sind als in den Negativkontrollen, die mit Medium TC 199 angesetzt waren. (Dunnett-Test  $p = 0.05$ )

##### 3.4.1. Negativkontrollen

Die SCE-Raten der Kontrollen sind den Tabellen 10 bis 14a zu entnehmen. Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den O-KO, Lösungsmittelkontrollen und Cyclophosphamidkontrollen ohne metabolische Aktivierung.

Die SCE-Raten variieren in den Negativkontrollen zwischen 4,1 und 7,5 (Tabellen 10, 12 und 13). Nur im Versuch SCE- 5 liegen die SCE-Raten der Negativkontrollen bei 10,68 (O-KO) und 12,80 (DMSO-KO). Ein erneuter unabhängiger Versuch mit dem Blut des gleichen Spenders bestätigte die hohe SCE-Rate dieses Spenders.

Die Mitoseindices variieren stark, zeigen aber keine Beeinflussung durch Lösungsmittel in den verwendeten Konzentrationen (1%), durch Cyclophosphamid ohne Aktivierung oder durch das Aktivierungsgemisch.

In den differentiell angefärbten Präparaten wurden zusätzlich die Raten 1. 2. und 3. Mitosen bestimmt (Prolifera-

tionsmuster). Dabei sind die Werte von Experiment zu Experiment unterschiedlich. Diese Unterschiede sind spenderspezifisch und durch die unterschiedliche Kulturdauer in den verschiedenen Experimentalserien bedingt. Die Variabilität innerhalb eines Experiments zwischen den Negativkontrollen ist hier gering. Der Anteil 2. und 3. Mitosen ist in den Versuchen mit 24-stündiger Kultivierung ab Behandlung (CA+ und CA+ Dy) niedriger als in den Versuchen mit 48-stündiger Kultivierung ab Behandlung.

### 3.4.2. Positivkontrollen

Die Positivkontrollen mit Trenimon führten zu einer dosisabhängigen Steigerung der SCE-Raten. Der Mitoseindex ist noch nicht wesentlich reduziert, eine Verzögerung beginnt bei  $5 \times 10^{-8}$  M (Tabelle 11 und 11a).

Cyclophosphamid als Positivkontrolle für die Funktionieren der metabolischen Aktivierung im Lymphozytentestsystem führt zu einer großen Variabilität der SCE-Rate. Es sind minimal Erhöhungen von etwa 80% bis zu etwa einer Versechsfachung der SCE-Raten erzielt worden. Dabei sind als Faktoren für die Variabilität 1. unterschiedliche Spenderblute, 2. unterschiedliche S9-Chargen, 3. unterschiedliche Behandlungsschemata anzusehen.

Mit Ausnahme des Versuchs SCE+ Dy 4 ist in allen Versuchen eine dosisabhängige Steigerung der SCE-Raten mit signifikanten Erhöhungen durch CP + S9-Mix in Konzentrationen von  $5 \times 10^{-6}$  M und  $1 \times 10^{-5}$  M aufgetreten (Tabellen 14 und 14a). Im Versuch SCE+ Dy 4 ist die SCE-Rate gegenüber den Kontrollen erhöht, es wurde aber keine Dosis-Effekt Beziehung gefunden.

Die Mitoseindices sind im Vergleich zu den Negativkontrollen nicht reduziert. Die Proliferation ist bei  $5 \times 10^{-6}$  M kaum und bei  $1 \times 10^{-5}$  M deutlich verzögert.

Die sehr stark variierenden Ergebnisse der Positivkontrollen mit Cyclophosphamid (Tabellen 16 und 16a) führten zu einem Vergleich verschiedener Chargen S9-Fraktion unter identischen Bedingungen (SCE+ Dy 6, (Tabelle 15)).

Verwendet wurden die Chargen REL 091 (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Madle, BGA Berlin), aufbewahrt in Flüssigstickstoff und RFI 115 aus den Beständen der Fa. Schering AG, aufbewahrt im Tiefkühlschrank bei  $-80^{\circ}$  C. Die Chargen wurden im SCE-Test mit Cyclophosphamid verglichen. Jeder S9-Mix wurde in 2 Konzentrationen getestet.

- 1. Konzentration 0,4 mg Proteingehalt pro ml Kulturmedium
- 2. Konzentration 0,6 mg/ml.

Hohe Konzentrationen (0,6 mg/ml) S9-Mix aktivierten Cyclophosphamid schlecht. Bei einem Proteinanteil von 0,4 mg/ml

in der Kultur führen beide Chargen zu einer von der Cyclophosphamid-Konzentration abhängigen Steigerung der SCE-Raten, wobei die Aktivierungskapazität der beiden Chargen sich fast genau um den Faktor zwei unterscheidet. Charge RFI 115 führt zu doppelt so hohen SCE-Raten wie REL 091 (Tabelle 15).

In Tabelle 16 sind die prozentualen Erhöhungen der SCE-Raten bei Cyclophosphamid-Behandlung mit verschiedenen S9-Chargen nach der Art des Experimentalansatzes aufgeführt. Die unterschiedlichen Versuchsbedingungen führen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Die geringste Erhöhung wurde bei direkter Zugabe des S9-Mix und einstündiger Substanzbehandlung erzielt (SCE+ 1), die stärkste Erhöhung bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-6}$  M wurde mit Dauerbehandlung der Substanz und Einschluß des Aktivierungsgemischs im Dialyseschlauch erreicht (SCE+ Dy 1).

In Tabelle 16a sind die Versuchsergebnisse mit verschiedenen S9-Chargen zusammengestellt. Charge RFC 032 hatte eine sehr geringe Aktivierungskapazität, wirkte aber stark toxisch. Mehrere durchgeführte Versuche mit dieser Charge führten zu nicht auswertbaren Präparaten mit niedrigen Mitoseindices und schlechten Präparaten. Im einzigen auswertbaren Versuch (SCE+ Dy 4) war die SCE-Rate durch Cyclophosphamid + S9-Mix in den Konzentrationen  $5 \times 10^{-6}$  M und  $1 \times 10^{-5}$  M nur um 82 bzw. 95% gegenüber der O-KO erhöht. Das ist knapp unter der Signifikanzgrenze ( $p = 0,05$ , Dunnett-Test). Die übrigen S9-Chargen führten jeweils zu einer signifikanten Erhöhung der SCE-Raten.

### 3.4.3. SCE-Raten nach Behandlung mit den Testsubstanzen

Die Ergebnisse der SCE-Analysen für MBC, DES, Estradiol und Progesteron werden gesondert dargestellt, Estron, Testosteron und Androstanolon ohne und mit metabolischer Aktivierung werden wegen der Gleichartigkeit der Resultate gemeinsam besprochen.

1. MBC: MBC hat keinen Einfluß auf die SCE-Rate, das gilt sowohl für die Versuche ohne (Tabelle 19) und mit S9-Mix (Tabellen 20 und 21). Der Mitoseindex bleibt durch MBC unverändert oder steigt in hohen Konzentrationen bei Dauerbehandlung sogar an. MBC führt zu deutlichen Veränderungen der Proliferationsmuster. In den Versuchen ohne Aktivierung (SCE-) sind ab  $1 \times 10^{-6}$  M keine 3. Mitosen mehr nachzuweisen. Zwischen  $1 \times 10^{-5}$  M und  $2 \times 10^{-5}$  M tritt ein Proliferationsminimum auf, bei höheren Konzentrationen sind gehäuft tetraploide 2. Mitosen nachweisbar. Ab  $5 \times 10^{-5}$  M ist eine komplette Polyploidisierung erreicht. Bei  $4 \times 10^{-4}$  M (Lös-

lichkeitsgrenze) sind sehr wenig 2. Mitosen nachzuweisen, fast alle Metaphasen sind 1. Mitosen und es kommt zu Pyknoten und extrem kondensierten Chromosomen. Offenbar führt MBC zu einer Metaphasearretierung.

Mit metabolischer Aktivierung sind bei „Pulsbehandlung“ keine derartigen Effekte zu beobachten, die SCE-Rate, der Mitoseindex und die Proliferation entsprechen weitgehend den Negativkontrollen (Tabelle 20).

Metabolische Aktivierung und Langzeitbehandlung mit MBC läßt die SCE-Rate unbeeinflußt, der Mitoseindex ist hoch. Nach 48 Stunden Dauerbehandlung (SCE+ Dy 1) sind die 1. Mitosen arretiert und die 2. Mitosen komplett polyploid, bei 24-stündiger Behandlung ist die Zahl der 2. und 3. Mitosen reduziert und die 2. Mitosen sind teilweise tetraploid (Tabelle 21). Die SCE-Raten wurden soweit als möglich in diploiden 2. Mitosen bestimmt, es wurden aber auch tetraploide Mitosen nach SCEs ausgewertet. Die für einen tetraploiden Chromosomensatz ermittelte SCE-Rate wurde halbiert.

DES: In den Versuchen ohne S9-Mix (SCE- 1, SCE- 6 und SCE- 8,) sind die SCE-Raten bis  $1 \times 10^{-7}$  M nicht erhöht. Im Bereich zwischen  $1 \times 10^{-6}$  M und  $1 \times 10^{-5}$  M sind geringfügige Erhöhungen der SCE-Raten festzustellen (Tabelle 24). Die Raten liegen hier bei 7,08 bis 9,16 SCE im Vergleich zu 6,00 bis 7,08 in den Kontrollen. Der Anstieg der SCE-Rate auf 9,16 ist in Parallelkulturen ( $n = 2 \times 25$ ) fast identisch und nach der statistischen Analyse im Dunnett-Test bei einem Signifikanzniveau von  $p = 0,05$  signifikant.

Bei Konzentrationen von  $1 \times 10^{-4}$  M und höher waren keine 2. Mitosen mehr auswertbar, es setzte eine starke Zellzyklusverzögerung ein, die ähnlich wie beim MBC zu einer Arretierung in der 1. Mitose führte. Der Mitoseindex ist dabei konstant hoch. In noch höheren Konzentrationen ( $10^{-3}$  M) wirkt DES toxisch. Die Blutkulturen sind hämolysiert. In den Präparaten sind zerstörte Zellen aber keine Mitosen mehr nachweisbar.

Aufgrund der Arbeit von HILL und WOLFF (1982) wurden Versuche zur Bestimmung der SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung in einem Konzentrationsbereich zwischen  $1 \times 10^{-5}$  M und  $8 \times 10^{-5}$  M durchgeführt. Dabei wurde das Blut einer Schwangeren und das Blut einer männlichen Person zur Kultivierung verwendet. Die verschiedenen Blute wurden mit demselben Medienansatz zur gleichen Zeit kultiviert und behandelt. Die Resultate (Tabelle 25) zeigen, daß beim weiblichen Spenderblut die Erhöhung von 5,68 auf 7,88 SCEs bei einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5}$  M DES erfolgte. Beim männlichen Spenderblut erhöhte sich die SCE-Rate von 5,48 auf 7,40 SCE bei  $4 \times 10^{-5}$  M DES.

Bei einer DES-Konzentration von  $8 \times 10^{-5}$  M sind nur noch 1. Mitosen nachweisbar. Polyploidisierung war in diesen Versuchen nicht feststellbar.

In den Versuchen mit metabolischer Aktivierung führte DES bei Pulsbehandlung nicht zu erhöhten SCE-Raten (Tabelle 26). Der Mitoseindex und das Proliferationsverhalten waren nicht oder kaum beeinträchtigt. Im Versuch CA+ Dy 1 wurden in den hohen Konzentrationen pyknotische Zellen und stark kondensierte Chromosomen beobachtet.

In den Versuchen mit metabolischer Aktivierung im Dialyseschlauch (SCE+ Dy, Tabelle 27) wurden erhöhte SCE-Raten ermittelt. Nach 48-stündiger Dauerbehandlung mit DES (SCE+ Dy1) fanden sich bei der höchsten auswertbaren Konzentration ( $1 \times 10^{-5}$  M) 9,28 SCEs gegen 5,80 SCE in der Lösungsmittelkontrolle. Bei  $1 \times 10^{-4}$  M sind bei unverändert hohem Mitoseindex alle Metaphasen in 1. Mitose. Nach 24-stündiger Behandlung mit DES (SCE+ Dy 2 und 3) ist die SCE-Rate erst bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M erhöht, bei dieser Konzentration ist zudem ein vermehrtes Auftreten tetraploider 2. Mitosen feststellbar.

Estradiol: Ohne metabolische Aktivierung hat Estradiol keinen Einfluß auf die SCE-Raten. Bis  $1 \times 10^{-5}$  M bleibt der Mitoseindex und die Proliferation unbeeinflusst, ab  $1 \times 10^{-4}$  M sind nur noch Zellen in 1. Mitose nachzuweisen (Vgl. MBC, DES). Eine Konzentration von  $1 \times 10^{-3}$  M Estradiol wirkt toxisch; die Zellen sind agglutiniert, lysiert und es treten kaum noch Mitosen auf (Tabelle 30).

Bei den Versuchen mit metabolischer Aktivierung muß ebenfalls zwischen Kurzzeit- und Langzeitbehandlung unterschieden werden. Außer im Versuch CA + Dy 1 sind bei Pulsbehandlung keine Effekte auf die SCE-Rate, den Mitoseindex und die Proliferation durch Estradiol nachweisbar. Im Versuch CA+ Dy 1 ist die Proliferation leicht verzögert (Tabelle 31).

Bei Dauerbehandlung mit Estradiol in Versuchen mit S9-Mix ist die SCE-Rate bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M leicht erhöht. Diese Erhöhung ist in Parallelkulturen gleich stark: SCE+ Dy 2: ( $n = 2 \times 25$ : 8,68 SCE/Metaphase). Auch im Wiederholungsversuch ist eine ähnliche Erhöhung der SCE-Rate bei  $1 \times 10^{-4}$  M zu beobachten. In allen Fällen bleibt die Erhöhung knapp unter dem Signifikanzniveau ( $p = 0,05$ , Dunnett-Test), (Tabelle 32). Die Mitoseindizes sind nicht reduziert, jedoch ist wie bei MBC und DES eine deutliche Beeinflussung der Proliferationsmuster bei  $1 \times 10^{-4}$  M zu erkennen, 3. Mitosen fehlen hier völlig und die Mitoseindizes bleiben bis zur toxischen Grenze hoch. Bei Langzeitbehandlung mit Estradiol sind einige Metaphasen in 2. Mitose te-

traploid, dieser Effekt ist schwächer ausgeprägt als bei MBC und DES.

Progesteron: Ohne metabolische Aktivierung beeinflusst Progesteron die SCE-Rate, den Mitoseindex und die Proliferation nicht (Tabelle 40). Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M sind zytotoxische Effekte (Agglutination der Zellen, Pyknose und Ausbleiben von Mitosen) zu beobachten.  $5 \times 10^{-4}$  M Progesteron führt zur Hämolyse in den Kulturen, wonach in den Präparaten nur noch zerstörte Zellen nachweisbar sind. Pulsbehandlung mit metabolischer Aktivierung läßt eine Auswertung bis zu einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M zu. Hierbei bleiben die SCE-Raten, die Mitoseindices und die Proliferation bei den Versuchen CA+ 1 und CA+ Dy 1 gegenüber den Kontrollen unverändert (Tabelle 41). Im Versuch SCE+ 1 scheint bei  $1 \times 10^{-4}$  M eine Erhöhung der SCE-Rate vorzuliegen (knapp unter der Signifikanzgrenze im Dunnett-Test), die Mitoseindices und Proliferationsindices bleiben aber auch hier unbeeinflusst.

Bei Langzeitbehandlung mit Aktivierung im Dialyseschlauch ohne Auswaschen der Substanzen (SCE+ Dy 1, Tabelle 42)) führt Progesteron bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M zu einer Verdopplung der SCE-Rate (statistisch signifikant). Der Mitoseindex ist nicht reduziert. Bei der Proliferation setzt eine beginnende Hemmung ein. Die Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M reduziert den Mitoseindex stark und die Proliferation ist stark verzögert. Diese Verzögerung ist nicht durch die Arretierung der Zellen in der Mitose bedingt. Nach einer 24-stündigen Exposition der Kulturen mit  $1 \times 10^{-5}$  M Progesteron ist die SCE-Rate im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle erhöht (SCE+ Dy 2, Tabelle 42). Bei  $1 \times 10^{-4}$  M ist die SCE-Rate wieder auf dem Kontrollniveau, der Mitoseindex ist nicht reduziert, die Proliferation ist verzögert.

In der Wiederholung dieses Versuchs (SCE+ Dy 3, Tabelle 42) mit drei Konzentrationen von Progesteron ( $1 \times 10^{-5}$  M,  $5 \times 10^{-5}$  M und  $1 \times 10^{-4}$  M) ist die SCE-Rate in den niedrigen Konzentrationen schwach erhöht und bei  $1 \times 10^{-4}$  M knapp verdoppelt (statistisch signifikant). Der Mitoseindex ist nicht reduziert, die Proliferation ist verzögert.

Estron, Testosteron und Androstanolon:

Estron (Tabellen 35 bis 37), Testosteron (Tabellen 45 bis 47) und Androstanolon (Tabellen 50 bis 52) haben auf die SCE-Raten sowohl ohne als auch mit metabolischer Aktivierung keinen Einfluß.

Auch bei Puls- und Dauerbehandlung mit diesen Substanzen in Gegenwart von S9-Mix sind die SCE-Raten nicht erhöht. Die Mitoseindices bleiben unverändert hoch und die Prolifera-

tionsmuster sind fast unverändert.

In Versuchen mit metabolischer Aktivierung ist nach Behandlung mit Estron bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M (SCE+ Dy 2, Tabelle 37) die SCE-Rate von 6,16 in der DMSO-KO auf 9,08 erhöht. Dieses Ergebnis konnte in der Parallelkultur (Estron: 6,56 / DMSO-KO: 6,88) nicht bestätigt werden. Auch im Wiederholungsversuch ist die erhöhte SCE-Rate nicht reproduzierbar (SCE+ Dy 3: Estron: 6,32 / DMSO-KO: 6,40).

#### Zusammenfassung der Ergebnisse

Keine der 7 Testsubstanzen induziert strukturelle Chromosomenaberrationen in Lymphozyten in vitro, das gilt sowohl für die Versuche mit als auch ohne Aktivierung.

Getestet wurden Konzentrationen bis zur Obergrenze der Löslichkeit in DMSO bei einer Endkonzentration von DMSO in den Kulturen von 1%. Die Obergrenze der Löslichkeit stellt bei den Hormonen auch die Toxizitätsgrenze bei langfristiger Behandlung für Lymphozyten dar ( $5 \times 10^{-4}$  M /  $1 \times 10^{-3}$  M). Für MBC ist eine zytotoxische Wirkung bei der Obergrenze der Löslichkeit noch nicht erreicht.

Von den 7 Substanzen induziert nur DES ohne metabolische Aktivierung eine leichte Erhöhung der SCE-Rate (Dauerbehandlung: Erhöhung der SCE-Rate 35 - 40%). Die wirksamen Konzentrationen liegen zwischen  $1 \times 10^{-5}$  M und  $1 \times 10^{-4}$  M.

Bei Kurzzeitbehandlung mit metabolischer Aktivierung induziert keine der 7 Substanzen eine erhöhte SCE-Rate.

Bei Dauerbehandlung mit metabolischer Aktivierung führen DES, Estradiol und Progesteron zu einer schwachen Erhöhung der SCE-Raten. Die wirksamen Konzentrationen liegen zwischen  $1 \times 10^{-5}$  M und  $1 \times 10^{-4}$  M. Die Erhöhung beträgt maximal 60% für DES, 41% für Estradiol und 86% für Progesteron.

Bei MBC, DES und Estradiol läßt der Mitoseindex in Verbindung mit dem Proliferationsverhalten auf die Arretierung der Zellen in der Metaphase schließen. Diese Effekte sind nur in Langzeitkulturen und bei Langzeitbehandlung mit den Substanzen nachweisbar.

Für MBC, DES und Estradiol ist in den Versuchen mit Aktivierung im Dialyseschlauch und Auswaschen der Substanzen nach 24 Stunden eine Tendenz zur Bildung polyploider Zellen zu erkennen. Bei MBC tritt dieser Effekt auch nach Dauerbehandlung (ohne und mit S9-Mix) auf.

### 3.5. Ergebnisse der Versuche zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen durch Zellteilungsstörungen und Polyploidisierung

#### 3.5.1. Arretierung von Mitosen in Metaphase

Versuch MI 1: In 48-Stunden-Kulturen mit HAM's F10 wurde MBC 4 Stunden vor Aufarbeitung in mehreren Konzentrationen zugegeben. Zum Vergleich dienten O-KO und COLC-KO. MBC erhöht die Mitoserate in dosisabhängiger Weise. In Konzentrationen bis  $1 \times 10^{-6}$  M ist keine Erhöhung der Mitoserate nachweisbar. Bei  $5 \times 10^{-6}$  M ist der Mitoseindex gegenüber der O-KO verdoppelt und erreicht ab  $1 \times 10^{-5}$  M und höheren Konzentrationen ein Plateau. Dabei ist die Mitoserate verdreifacht und entspricht ca. 75% der Colcemidkontrolle. Die arretierten Mitosen haben das Aussehen von C-Metaphasen (Tabelle 53, Abbildung 1).

Versuch MI 2: Im Versuch MI 2 wurden alle 7 Testsubstanzen unter gleichen Versuchsbedingungen wie im Versuch MI 1 bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M auf mitosearretierende Wirkungen geprüft. MBC arretierte bei gleicher Konzentration die Mitosen wie im vorherigen Versuch. DES und Estradiol erhöhten ebenfalls die Mitoserate (64% bis 78% der COLC-KO). Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon hatten keinen Einfluß auf die Mitoseraten (Tabelle 53a).

Die mitosearretierenden Substanzen MBC, DES und Estradiol wurde in weiteren Versuchen zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen im Lymphozytentestsystem eingesetzt.

#### 3.5.2. Mikrokerne

Im Versuch MI 3 wurden die Substanzen MBC, DES und Estradiol hinsichtlich ihrer Fähigkeit untersucht, Mikrokerne in Interphasen der Lymphozyten in vitro zu induzieren.

Die Behandlung erfolgte 40 Stunden nach Kulturansatz mit HAM's F10, im G<sub>2</sub>-Stadium des Zellzyklus vor dem Erreichen der 1. Mitose. Nach 68 Stunden (in der 2. Interphase) wurden die Kulturen aufgearbeitet. Die Aufarbeitung wurde mit isotoner Kochsalzlösung statt mit hypotonem Schock durchgeführt, um das Zytoplasma zu erhalten. Die Präparate wurden zweimal ausgewertet. Bei der ersten Auswertung wurden alle Lymphozyten berücksichtigt, auch wenn der Plasmasmaum nicht deutlich sichtbar oder wenn er beschädigt war. In der zweiten Auswertung wurden nur Lymphozyten mit voll erhaltenem Plasmasmaum gewertet (Tabelle 54).

Die Mikrokernrate in den Kontrollen lag zwischen 0 und 4 Mikrokernen (MK) pro 1000 ausgewerteten Zellen.

Mit MBC setzt der Effekt der Mikrokernbildung bei  $1 \times 10^{-6}$  M

(18 MK) ein und steigt konzentrationsabhängig an (bis 230 MK).

Beim Mitoseindex ist mit MBC der gleiche Effekt zu beobachten wie im Versuch MI 1. Der Mitoseindex ist ab  $5 \times 10^{-6}$  M erhöht und erreicht bei  $1 \times 10^{-5}$  M ein Plateau.

Erhöhte Mikrokernraten sind mit DES ab  $1 \times 10^{-5}$  M nachweisbar (14 MK). Die MK erreichen ein Maximum bei  $5 \times 10^{-5}$  M (118 MK) und sind bei  $1 \times 10^{-4}$  M noch in hohen Raten vorhanden (62 MK). Der Mitoseindex ist bei  $5 \times 10^{-5}$  M stark erhöht, fällt bei höheren Konzentrationen aber wieder ab.

Mit Estradiol sind Mikrokerne ebenfalls ab  $1 \times 10^{-5}$  M nachweisbar (12 MK), die Mikrokernrate steigt mit höheren Konzentrationen an ( $1 \times 10^{-4}$  M: 116 MK).

Mit Colcemid als Kontrolle konnte bei Konzentrationen von  $1 \times 10^{-8}$  und  $2 \times 10^{-8}$  M (1/10 bzw. 1/20 der Konzentration, die zur Arretierung von Zellen in Metaphase dient) noch keine deutliche Erhöhung der Mikrokernrate festgestellt werden.

Nach Behandlung mit hohen Konzentrationen MBC, DES und Estradiol sind außer der Anhäufung von Mitosen und der Bildung von Mikrokernen noch andere Anomalien wie Ausstülpungen an Hauptkernen, Zellen mit zwei Hauptkernen, Brückenbildungen zwischen Kernen, vergrößerte Kerne, Anaphasefiguren mit liegendegebliebenen Chromosomen und multipolare Anaphasen zu beobachten (Abbildungen 2 und 3). Die Anomalien wurden zur Bewertung der Mikrokernrate nicht mit herangezogen. Eine Einbeziehung aller Kernanomalien würde die Auswertung komplizieren. Ein anderer Aspekt ist, daß geprüft werden sollte, ob nur durch die Auswertung der Mikrokerne eine sichere Beurteilung von numerischen Chromosomenaberrationen vorgenommen werden kann.

Als Mikrokerne wurden die Kerne gewertet, die maximal 1/4 bis 1/3 der Größe des Hauptkerns erreichten. Während der Auswertung wurden in allen Präparaten gelegentlich und in einigen Präparaten gehäuft nekrotische Zellkerne beobachtet, deren Häufigkeit ebenfalls bestimmt wurde. In diesen Kernen ist die gleichmäßige Chromatinstruktur der Interphasekerne aufgelöst. Neben Chromatinbereichen, die nur schwach anfärbbar sind, treten dichte Klumpen von zusammengeballtem Chromatin auf. Solche Kerne wurden in einem bestimmten Areal der Objektträger ausgezählt (2 Bahnen bei 250-facher Vergrößerung im ersten Drittel des Objektträgers), (Abbildung 2c).

Im getesteten Konzentrationsbereich hat MBC keinen Einfluß auf die Rate nekrotischer Kerne. Die Anzahl der nekrotischen Kerne entspricht etwa der Häufigkeit in den Negativkontrollen (1 bis 7 pro 1000). DES erhöht dosisabhängig ab  $1 \times 10^{-5}$  M die Anzahl nekrotischer Kerne (bis 44 pro 1000) und nach Einwirkung von Estradiol ist in den höchsten Kon-

zentrationen ein deutlicher Anstieg (53 pro 1000) feststellbar (Tabelle 54a).

### 3.5.3. C-Banden und Chromozentren

Bei der Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen konnten keine erhöhten Aberrationsraten nachgewiesen werden. MBC, DES und Estradiol induzieren aber Mikrokerne. Diese Mikrokerne könnten somit das Ergebnis von Spindelstörungen sein. Es sollte nachgewiesen werden, ob die Mikrokerne tatsächlich aus ganzen Chromosomen gebildet wurden.

Zu diesem Zweck wurde das zentromernahe Heterochromatin (C-Banden) in Präparaten des Versuchs MI 4 angefärbt. Von einigen Präparaten wurden die C-Banden der Metaphasechromosomen ausgewertet und aus denselben Präparaten oder von Präparaten mit der gleichen Anfärbung wurden in Interphasekernen die dunkler gefärbten (heterochromatischen) Bereiche gezählt. Zusätzlich wurde die Anzahl heterochromatischer Bereiche noch in den Interphasekernen von Präparaten eines anderen Versuchs bestimmt (MI 6), die mit hypotonem Schock aufgearbeitet und mit Giemsa normal gefärbt waren.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 55 aufgeführt: In 50 ausgewerteten Metaphasen mit C-Bandenfärbung waren bei etwa 50% der Chromosomen C-Banden zu identifizieren (mittlere Häufigkeit von C-Banden pro Metaphase: 23,2). In den Interphasekernen desselben Versuchs waren im Mittel 17,4 heterochromatische Bereiche sichtbar. Ohne spezielle Anfärbung waren ca. 19,5 heterochromatische Bereiche pro Interphasekern zu erkennen.

C-Banden sind in Metaphasechromosomen mit etwa gleicher Häufigkeit nachweisbar wie heterochromatische Bereiche in Interphasekernen bei gleicher Färbemethode oder ohne spezielle Anfärbung. Diese Ergebnisse, die Gleichartigkeit der Differenzierung der Farbtintensität der Zentromerregion bei Metaphasechromosomen und der heterochromatischen Bereiche in Interphasekernen (und die Gleichartigkeit der heterochromatischen Bereiche mit und ohne spezielle C-Bandenfärbung in Form, Größe und Häufigkeit) lassen den Schluß zu, daß es sich bei den heterochromatischen Bereichen der Interphasekerne in beiden Versuchen um das zentromernahe Heterochromatin (Chromozentren) wie bei den Metaphasechromosomen handelt (Abbildung 3).

Weiterhin konnte beobachtet werden, daß die C-Bandenfärbung deutlicher ist und mehr Chromosomen umfaßt, wenn die Mitosen noch in Prophase oder früher Metaphase sind. Mit zunehmender Kondensation der Chromatiden nimmt die Fähigkeit zur differentiellen C-Bandenmarkierung ab.

Eine gleichmäßige C-Bandenfärbung über ein gesamtes Präparat war nicht zu erreichen, so daß die Chromozentren nach C-Bandenfärbung nicht zu einer quantitativen Analyse verwendet werden konnten. Die heterochromatischen Bereiche stimmen in Giemsa-normal gefärbten Präparaten nach Größe, Form und Häufigkeit mit denen in C-Banden-gefärbten Präparaten überein. Deshalb erscheint es möglich, Mikrokerne mit Zentromerregionen auch in normal gefärbten Präparaten auszuwerten.

Dabei hat die Aufarbeitungsmethode (hypotone KCl-Lösung, isotone NaCl-Lösung) ebenfalls einen Einfluß. In KCl-behandelten Präparaten mit Giemsa-Normalfärbung sind die Interphasen normalerweise gleichmäßig gefärbt, in NaCl-behandelten Präparaten ist eine differenziertere Kernstruktur mit heterochromatischen Bereichen sichtbar.

Deshalb wurden in den Versuchen MI 4 und MI 5 die Mikrokerneln in 1000 Interphasen bestimmt. Die Mikrokerne wurden nach solchen ohne und mit sichtbaren heterochromatischen Bereichen unterschieden (Tabelle 56).

In den Präparaten unbehandelter Kontrollen hatte keiner von 8 Mikrokerneln sichtbare Chromozentren, in Trenimonpräparaten 4,5% von 44, während in Colcemid-behandelten Präparaten in 71,6% der Mikrokerne Chromozentren zu erkennen waren. Werte über 50% für Mikrokerne mit Chromozentren wurden in Präparaten nach Behandlung mit MBC (55,0%), DES (55,2%) und Estradiol (61,5%) gefunden.

#### 3.5.4. Polyploidisierung

In den Versuchen MI 4 und MI 5 (Tabellen 57, 57a und 58) und MI 6 bis 9 (Tabelle 59 und 60) wurden die Anteile polyploider Mitosen an der Gesamtmitoserate bestimmt.

In den Versuchen MI 4 und MI 5 wurde zu Kulturbeginn BUdR zugegeben, nach differentieller Chromatidenanfärbung ist daher eine Unterscheidung möglich, ob die Zellen bis zur Fixierung ein, zwei oder drei Zellzyklen durchlaufen haben. Es ist zu erwarten, daß bei Polyploidisierung in der 1. Mitose die 2. Mitosen tetraploid sind. Bei erneuter Polyploidisierung sollten in der 3. Mitose oktaploide Metaphasen auftreten (siehe Abbildung 5).

In den Negativkontrollen ist ohne metaphasearretierende Substanzen der Mitoseindex niedrig und die wenigen Mitosen sind in allen Mitosestadien anzutreffen. Bei diesen Präparaten war deshalb der Umfang der ausgewerteten Stichprobe kleiner. In insgesamt 400 ausgewerteten Mitosen der Negativkontrollen der Versuche MI 4 und MI 5 war eine tetraploide 2. Mitose zu finden. Das Maximum der Mitosen war nach 70 Stunden erwartungsgemäß in der 2. Teilungsphase und nach 90 Stunden in der 3. Teilungsphase.

Trenimon verzögerte die Proliferation. Der Mitoseindex war im Vergleich zu den Negativkontrollen vermindert. Polyploide Mitosen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Behandlung mit Colcemid führte zu hohen Mitoseindices. Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  M ist nach 70 Stunden die Arretierung in der 1. Mitose fast komplett. Der Anteil diploider 2. Mitosen kann durch schnell proliferierende Lymphozyten erklärt werden, die bei Substanzzugabe den ersten Zellzyklus schon durchlaufen hatten und sich in der 2. Interphase befanden. Nach 70 Stunden wurde eine tetraploide 3. Mitose gefunden, die wahrscheinlich in der 2. mitotischen Teilung durch Colcemid polyploidisiert wurde. Nach 90 Stunden ist der Anteil mitotischer Zellen geringer. Die C-Metaphasen in 1., 2. und 3. Mitose sind diploid. Polyploide Mitosen sind nicht nachzuweisen.

Bei der höheren Colcemid-Konzentration (identisch mit der Konzentration zur Arretierung der Mitosen in Versuchen zur Auswertung struktureller Chromosomenaberrationen und SCEs) wird ein hoher Anteil von Zellen nach 70 Stunden in Metaphase arretiert (99% diploide 1. und 2. Mitosen); gleichzeitig traten 3 tetraploide 2. und 3. Mitosen auf (1%). Auch nach 90 Stunden ist der Metaphasearrest noch sehr ausgeprägt (Mitoseindex: 12,6%); 95,7% der 1. und 2. Mitosen sind diploid. Zudem wurden 10 tetraploide 2. Mitosen und 2 tetraploide 3. Mitosen (zusammen 4%) gefunden. Eine 3. Mitose war diploid.

Die Fähigkeit von MBC, in hohen Konzentrationen Metaphasen zu arretieren, ist geringer als für das Colcemid. Bei  $1 \times 10^{-5}$  M scheint nach 70 Stunden ein Teil der Mitosen den mitotischen Block schon überwunden zu haben ohne daß dabei eine Polyploidisierung im größeren Umfang eingetreten ist. Nur 0,7% der 2. Mitosen sind tetraploid. Nach 90 Stunden sind bei gleichbleibendem Mitoseindex etwa gleich viele diploide Metaphasen in 1. und 2. Mitose. Auch diploide 3. Mitosen sind vorhanden. 2,3% der 2. Mitosen sind tetraploid.

Bei höheren Konzentrationen ( $5 \times 10^{-5}$  M) wird die Fähigkeit zur Arretierung kaum ausgeprägter, aber die Fähigkeit zur Polyploidisierung nimmt zu. Nach 70 Stunden sind nur noch knapp 80% der 1., 2. und 3. Mitosen diploid, gut 20% 2. und 3. Mitosen sind tetraploid. Dieser Trend ist nach 90 Stunden noch besser zu sehen (etwa 60% diploide und 40% tetraploide 1., 2. und 3. Mitosen). Hier treten auch wenige oktaploide 3. Mitosen auf (0,7%). Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M ist die Polyploidisierung nahezu vollständig: Nur 2% der Mitosen, die mehr als einen Zellzyklus durchlaufen haben, sind diploid, alle anderen sind polyploid (12,3% nach 70 Stunden und 30% (darunter 0,7% Oktaploide) nach 90 Stun-

den). Der relativ geringere Prozentsatz an Polyploidien, verglichen mit dem bei  $5 \times 10^{-5}$  M ist einer ausgeprägteren Arretierung in 1. Mitose zuzuschreiben.

DES und Estradiol haben im Vergleich zu MBC bei gleichen Konzentrationen eine schwächere Polyploidisierungsaktivität. Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-5}$  M ist noch keine metaphasearretierende Wirkung nachweisbar. Erst bei  $5 \times 10^{-5}$  M ist der Mitoseindex deutlich erhöht und erreicht bei  $1 \times 10^{-4}$  M ein Maximum. In hohen Konzentrationen sinken die Mitoseindices nach längerer Kultivierungsdauer (90 Stunden) wieder ab. Bei  $1 \times 10^{-5}$  M sind bis auf eine Ausnahme alle Mitosen diploid (eine tetraploide 3. Mitose mit Estradiol nach 90 Stunden). Die Proliferation ist nach 70 Stunden nicht oder nur minimal verzögert, nach 90 Stunden ist die Verzögerung deutlich ausgeprägt.

DES führt ab einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  M zu polyploiden Mitosen. Nach 70 Stunden ist eine 3. Mitose (0,3%) und nach 90 Stunden sind 14 2. Mitosen (4,7%) tetraploid. Bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M nimmt der absolute Anteil polyploider Mitosen wieder ab (2% tetraploide 2. und 3. Mitosen nach 90 Stunden). Auch hier beruht das Absinken der absoluten Zahl von Polyploidien in der verstärkten Arretierung erster Mitosen.

Estradiol induziert Polyploidisierungen ebenfalls erst nach 90 Stunden bei einer Konzentration von  $5 \times 10^{-5}$  M. Die Potenz zur Polyploidisierung ist bei Estradiol wesentlich schwächer als bei MBC.

In Tabelle 58 sind die relativen Anteile polyploider Metaphasen an 2. und 3. Mitosen aufgeführt. In dieser Tabelle wird deutlich, daß zeit- und konzentrationsabhängig die polyploiden Mitosen am Anteil 2. und 3. Mitosen bei allen drei Testsubstanzen ansteigen. Nach 90 Stunden, in den jeweils höchsten Konzentrationen der Substanzen hat MBC die größte Polyploidisierungskapazität und übertrifft noch das Colcemid. DES erreicht nur die Hälfte und Estradiol nur etwa 1/4 der Polyploidisierungsaktivität von Colcemid.

In den Versuchen MI 6 bis MI 9 wurden die Häufigkeiten polyploider Mitosen zu vier Fixierungszeiten (72, 84, 96 und 112 Stunden nach Kulturbeginn) ausgewertet. Weil in diesen Versuchen keine differentielle Chromatidenanfärbung vorgenommen worden ist, kann hier die Häufigkeit der Polyploidien nur aus der Gesamtheit aller Mitosen bestimmt werden.

Die Ergebnisse dieses Versuchs sind aus Tabelle 59 zu ersehen. Mit längerer Kultivierungsdauer sind auch in den Negativkontrollen geringe Raten polyploider Mitosen nachweisbar (in der O-KO 1% nach 96 Stunden und 3% nach 112 Stunden, in

der DMSO-KO 1% nach 112 Stunden). Colcemid erhöht bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-7}$  M die Spontanrate nicht; bei  $2 \times 10^{-7}$  M ist eine zeitabhängige Zunahme polyploider Mitosen zu verzeichnen.

Mit MBC setzt die Wirkung bei  $1 \times 10^{-5}$  M nach 84 Stunden ein und bei  $5 \times 10^{-5}$  M ist der Effekt zum frühesten Aufarbeitungszeitpunkt (72 Std.) schon ausgeprägt. Der Anteil polyploider Mitosen steigt in beiden Konzentrationen zeitabhängig an.

Mit DES ist ein polyploidisierender Effekt nach 96 Stunden sichtbar aber erst nach 112 Stunden deutlich. Die höhere Konzentration erhöht die Polyploidisierungsrate nicht mehr wesentlich.

Estradiol erhöht die Rate polyploider Metaphasen nur in der höchsten getesteten Konzentration ab 96 Stunden nach Kultivierungsbeginn, die mit verlängerter Kultivierungsdauer (112 Stunden) nicht weiter zunimmt.

Als zusätzliche Information sind die Mitoseindices dieses Versuchs aus der Tabelle 60 zu entnehmen. Alle drei getesteten Substanzen erhöhen die Mitoseindices im Vergleich zu den Negativkontrollen.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Versuchen zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen

Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon hatten bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M keine metaphasearretierende Wirkung Humanlymphozyten in vitro.

MBC, DES und Estradiol erwiesen sich als wirksam:

- in der Arretierung der Lymphozyten in der Metaphase
- in der Bildung von Mikrokernen
- in der Fähigkeit zur Bildung polyploider Zellen

Diese Wirkungen sind von Substanz zu Substanz unterschiedlich:

MBC arretiert die Lymphozyten ab einer Konzentration von etwa  $5 \times 10^{-6}$  M. In den höchsten getesteten Konzentrationen beträgt die Arretierungskapazität etwa 75% einer Colcemidkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M.

MBC induziert am wirksamsten Mikrokern und polyploide Mitosen. Die Fähigkeit zur Polyploidisierung ist in der höchsten getesteten Konzentration vollständig und damit höher als bei Colcemid. MBC polyploidisiert nach weniger als 70 Stunden und damit früher als Colcemid.

DES hat ein konzentrationsabhängiges Maximum bei  $5 \times 10^{-5}$  M für die Metaphasearretierung und für die Bildung von Mikrokernen. Die Fähigkeit zur Polyploidisierung ist in der gleichen Konzentration nachweisbar und bei  $1 \times 10^{-4}$  kaum weiter zu erhöhen. Die Mikrokernrate ist geringer als bei MBC und die Polyploidisierungskapazität beträgt etwa ein Drittel der des MBC. DES polyploidisiert nach ungefähr 96 Stunden und damit später als Colcemid.

Estradiol arretiert ab  $5 \times 10^{-5}$  M und induziert Mikrokerne mit einem Maximum in der höchsten getesteten Konzentration ( $1 \times 10^{-4}$  M) in etwa dem gleichen Maß wie DES. Estradiol hat ebenfalls die Fähigkeit zur Polyploidisierung. Die Kapazität ist etwa halb so groß wie die von DES. Die Polyploidisierung ist bei Estradiol etwa zum gleichen Fixierungszeitpunkt wie bei DES nachweisbar.

#### 4. DISKUSSION

In Tabelle 61 (siehe Seite 104) sind die Ergebnisse dieser Arbeit zusammengefaßt. Folgende Befunde sind Grundlage der Diskussion:

Alle Testsubstanzen (MBC, DES, Estradiol, Progesteron, Estron, Testosteron und Androstanolon) führen weder mit noch ohne metabolische Aktivierung in vitro zu einer Erhöhung der Rate struktureller Chromosomenaberrationen (4.1.).

Die SCE-Rate ist nach Langzeitbehandlung mit DES ohne und mit S9-Mix erhöht. Estradiol und Progesteron erhöhen nach Langzeitbehandlung nur mit metabolischer Aktivierung die SCE-Rate. MBC, Estron, Testosteron und Androstanolon führen nicht zu einer Erhöhung der SCE-Rate (4.2.).

MBC, DES und Estradiol erhöhen die Raten numerischer Chromosomenaberrationen (Mitosearretierungen, Mikrokerne, Polyploidien), (4.3.).

Für die Testsubstanzen Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon wurden keine Hinweise (Untersuchungen der Mitosearretierung bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M) auf eine Induktion numerischer Chromosomenaberrationen gefunden.

##### 4.1. Strukturelle Chromosomenaberrationen

###### MBC

MBC ist bisher in Mutagenitätstests noch nicht auf die Induktion struktureller Chromosomenaberrationen an Zellkulturen in vitro untersucht worden (Tabelle 1- 1c der Einleitung).

Die Beurteilung von KAPPAS (1981), daß Benomyl/MBC möglicherweise strukturelle Chromosomenaberrationen auslöst, basiert auf der Arbeit von STYLES und GARNER (1974), die in Zellkulturen den Einfluß von MBC auf die Zellteilung lediglich qualitativ untersucht haben. Es werden Chromosomenanomalien wie extreme Kondensation der Chromatiden, Chromatidentrennung ohne Anaphasekonfiguration und pyknotische Metaphasen erwähnt. Ähnliche Befunde erhielten BOYLE (1973); DASSENOY und MEYER (1973); DAVIDSE (1973); RICHMOND und PHILLIPS (1975) und RICHMOND und PRING (1977) nach Untersuchungen an Pflanzen und RUZICKA et al. (1975) an Feten behandelte Ratten.

Die von diesen Autoren beobachteten „Aberrationen“ wurden auch in der vorliegenden Untersuchung gefunden; sie sind

TABELLE 61:

Die Wirkung von Methyl 2-benzimidazolcarbamat (MBC), Diethylstilbestrol (DES), Estradiol, Estron, Progesteron, Testosteron, Androstanolon und Positivkontrollsubstanzen (Trenimon (TREN), Cyclophosphamid (CP), Colcemid (COLC)) auf die Häufigkeiten von strukturellen Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustauschen mit (+ S9 : Zugabe von S9-Mix; + S9 Dy: Zugabe von S9-Mix im Dialyseschlauch) und ohne (- S9) metabolische Aktivierung in vitro, sowie auf die Häufigkeiten numerischer Chromosomenaberrationen (Mitosearretierungen, Mikrokerne mit Chromozentren, Polyploidien) in menschlichen Lymphozytenkulturen. +: Substanzeffekt; -: kein Substanzeffekt; n.g.: nicht getestet.

| Untersuchtes<br>Phänomen                    | Testsubstanz |     |           | Progesteron | Estron<br>Testosteron<br>Androstanolon |      | Positiv-<br>kontrollen |
|---------------------------------------------|--------------|-----|-----------|-------------|----------------------------------------|------|------------------------|
|                                             | MBC          | DES | Estradiol |             |                                        |      |                        |
| <u>Strukturelle Chromosomenaberrationen</u> |              |     |           |             |                                        |      |                        |
| - S9                                        | -            | -   | -         | -           | -                                      | -    | TREN                   |
| + S9                                        | -            | -   | -         | -           | -                                      | -    | CP                     |
| + S9 Dy                                     | -            | -   | -         | -           | -                                      | -    | CP                     |
| <u>Schwesterchromatid-<br/>austausche</u>   |              |     |           |             |                                        |      |                        |
| - S9                                        | -            | +   | -         | -           | -                                      | -    | TREN                   |
| + S9                                        | -            | -   | -         | -           | -                                      | -    | CP                     |
| + S9 Dy                                     | -            | +   | +         | +           | -                                      | -    | CP                     |
| <u>Numerische Chromosomenaberrationen</u>   |              |     |           |             |                                        |      |                        |
| Mitosearretierungen                         | +            | +   | +         | -           | -                                      | -    | COLC                   |
| Mikrokerne (mit Chromozentren)              | +            | +   | +         | n.g.        | n.g.                                   | n.g. | COLC                   |
| Polyploidien                                | +            | +   | +         | n.g.        | n.g.                                   | n.g. | COLC                   |

aber keine echten strukturellen Chromosomenaberrationen. SEILER (1976, 1977) hatte bisher als einziger Metaphasechromosomen analysiert und nachgewiesen, daß MBC im Knochenmark des Chinesischen Hamsters keine strukturellen Chromosomenaberrationen induziert.

In der vorliegenden Arbeit ist zum ersten Mal quantitativ analysiert worden, ob MBC in Humanlymphozyten in vitro mit und ohne metabolische Aktivierung strukturelle Chromosomenaberrationen zu induzieren vermag. Eine Erhöhung der Rate struktureller Chromosomenaberrationen wurde nicht gefunden.

#### DES

DES wurde schon häufig auf mögliche mutagene Effekte untersucht (siehe Tabelle 2 - 2h). In vitro und in vivo bindet DES an die DNA und führt zu biochemisch nachweisbaren DNA-Bruchstücken (MELTZ et al., 1979; SINA et al., 1983). Derartige Befunde lassen vermuten, daß DES strukturelle Chromosomenaberrationen induzieren könnte.

Erhöhte Raten struktureller Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit DES fanden IVETT und TICE (1981) im Knochenmark der Maus und NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN, (1981) in CHO-Kulturen. Diese Ergebnisse konnten durch die vorliegende Untersuchung an Humanlymphozyten in vitro mit und ohne metabolische Aktivierung nicht bestätigt werden.

Die Unterschiede in den Ergebnissen sind möglicherweise mit der Verwendung verschiedener Testsysteme zu erklären. Die Erhöhung der Aberrationsrate in CHO-Zellen (NATARAJAN und VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN, 1981) konnte nur mit einer extrem hohen DES-Konzentration erzielt werden (etwa  $6 \times 10^{-3}$  M), bei der bereits Präzipitate im Kulturmedium auftraten. Diese Konzentrationen sind in Humanlymphozyten zytotoxisch. Eine mögliche Induktion struktureller Chromosomenaberrationen in anderen Zellkultursystemen - eventuell auch bei Verwendung von Humanzellen anderen Ursprungs (z.B. Fibroblasten) - kann bei sehr hohen DES-Konzentrationen daher nicht ausgeschlossen werden.

#### Steroide

Zu den vorliegenden Ergebnissen mit Steroidhormonen liegen bisher nur wenige vergleichbare Veröffentlichungen vor (Tabelle 3 a-c). Die meisten derartigen Untersuchungen lieferten keinen Hinweis auf eine mögliche mutagene Wirkung natürlich vorkommender Steroidhormone. Lediglich SEROVA und KERKIS (1974) fanden nach Behandlung mit Steroidhormonen in embryonalen Fibroblasten und Nierenepithelzellen des Menschen

erhöhte Raten struktureller Chromosomenaberrationen. Die Maximalraten lagen im Bereich einer Verdoppelung der Spontanrate. Es ist fraglich, ob diese minimalen Erhöhungen eine Aussage über mutagene Eigenschaften der Hormone zulassen. PRASAD und HAIDER (1982) fanden in Progesteron-induzierten Wurzeltumoren bei *Pisum sativum* erhöhte Raten von chromosomalen Aberrationen. Inwieweit strukturelle Chromosomenaberrationen in Wurzeltumoren auf mutagene Eigenschaften von Testsubstanzen schließen lassen, ist nicht bekannt.

Die metabolische Aktivierung in vitro wurde bei der Testung von Steroiden in dieser Arbeit erstmalig (bei negativem Befund) angewendet.

#### Kontrollen

Die Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen in unbehandelten Kontrollen und in Lösungsmittelkontrollen (Ethanol und DMSO) entsprechen im Gesamtmittel den Kontrollwerten, wie sie in anderen Labors gefunden werden (OBE, 1981; OBE und BEEK, 1982; OBE und RISTOW, 1977).

Erwartungsgemäß wurden erhöhte Raten struktureller Chromosomenaberrationen mit den als Positivkontrollen verwendeten Substanzen Trenimon (direktes Mutagen, ohne S9-Mix) und Cyclophosphamid (indirektes Mutagen, mit S9-Mix) in Dosis-entsprechenden Häufigkeiten induziert (MADLE, 1980; OBE und BEEK, 1979).

Die Ergebnisse der Positivkontrollen zeigen, daß die Versuchsbedingungen in den einzelnen Experimenten zum Nachweis der Induktion struktureller Chromosomenaberrationen durch direkte und/oder indirekte Mutagene adäquat waren.

Der S9-Mix hatte allein oder in Kombination mit DMSO keinen Einfluß auf die Raten von strukturellen Chromosomenaberrationen. Die Verwendung von S9-Mix zur Substanzaktivierung in Humanlymphozyten ist mit Schwierigkeiten behaftet, die weiter unten (siehe SCE-Kontrollen) diskutiert werden.

Bei den Versuchen ohne metabolische Aktivierung ist nicht auszuschließen, daß ein geringfügiger Anteil der ausgewerteten Metaphasen zweite Mitosen nach Behandlung waren (siehe OBE und BEEK, 1982). Das hierbei zu erwartende Ausmaß an mitotischer Selektion hätte jedoch kaum zu einer völligen Eliminierung eventuell induzierter struktureller Chromosomenaberrationen führen können.

#### 4.2. Schwesterchromatidenaustausche

In der vorliegenden Arbeit erhöhte DES bei Langzeitbehand-

lung die SCE-Rate ohne und mit metabolischer Aktivierung. Estradiol und Progesteron führten dagegen nur nach metabolischer Aktivierung und bei Langzeitbehandlung zu einer Erhöhung der SCE-Rate.

Alle anderen Substanzen (MBC, Estron, Testosteron und Androstanolon) beeinflussen die SCE-Häufigkeiten nicht.

Zur möglichen SCE-induzierenden Wirkung von MBC liegen in der Literatur keine vergleichbaren Studien vor. Verschiedene Alkylcarbamate (siehe Tabelle 1d) haben SCE-erhöhende Wirkungen, während Methylcarbamate (Seitenkette vom MBC) die SCE-Rate nicht erhöhte (CHENG et al., 1981).

In dieser Arbeit wurden keine Hinweise auf eine SCE-induzierende Wirkung von MBC nach Behandlung menschlicher Lymphozyten mit oder ohne metabolische Aktivierung gefunden.

Estron, Testosteron und Androstanolon, die nach den vorliegenden Untersuchungen ebenfalls nicht zu einer Erhöhung der SCE-Raten führen, sind bisher nicht auf die Induktion von SCEs untersucht worden und es liegen deshalb keine vergleichbaren Angaben in der Literatur vor.

#### DES, Estradiol und Progesteron

Bisherige Untersuchungen zur SCE-Induktion nach DES-Behandlung (siehe Tabelle 2f,g) zeigen kein einheitliches Bild. IVETT und TICE (1981) fanden im Knochenmark der Maus keine erhöhten SCE-Raten, obwohl in der gleichen Studie eine Erhöhung der Häufigkeiten struktureller Chromosomenaberrationen nachgewiesen wurde. Ähnliche Ergebnisse lieferten Untersuchungen an CHO-Zellen von EVANS und MITCHELL (1981) und von NATARAJAN und VAN KESTEREN VAN LEEUWEN (1981). In allen anderen Untersuchungen (ABE und SASAKI, 1982 a; HILL und WOLFF, 1982, 1983; PAIKA et al., 1981; RÜDIGER et al., 1979) waren die SCE-Raten nach DES-Behandlung maximal verdoppelt. Das entspricht den Erhöhungen, wie sie in der vorliegenden Arbeit gefunden wurden.

Nach Progesteron und Estradiol sind ähnlich wie nach DES die SCE-Raten nur geringfügig erhöht und maximal knapp verdoppelt. Ein Ergebnis liegt in der Literatur nur für Progesteron vor, das in Humanfibroblasten keinen Effekt auf die SCE-Rate hatte (KAWACHI et al., 1980).

Eine umfassende Untersuchung des Einflusses von natürlich vorkommenden Sexualsteroiden auf die SCE-Rate mit und ohne metabolische Aktivierung in vitro wurde in dieser Arbeit erstmals vorgenommen.

Der Nachweis von erhöhten SCE-Raten im allgemeinen ein sensibler Indikator für die Induktion von Mutationen (ABE und SASAKI, 1982 b). Die geringfügigen (aber reproduzierbaren) Erhöhungen der SCE-Raten nach Behandlung mit DES, Estradiol

und Progesteron könnten damit erklärt werden, daß DES, Estradiol und Progesteron metabolisiert werden und mutagene Stoffwechselprodukte entstehen. Entweder werden nur wenige Metaboliten gebildet, oder die Metaboliten sind selbst nur schwach mutagen. Bei den vorliegenden Ergebnissen in Frage gestellt werden, daß bei DES, Estradiol und Progesteron die Erhöhung der SCE-Raten als Folge einer direkten Interaktion dieser Substanzen mit der DNA auftreten.

Mit den meisten mutagenen Substanzen ist eine Erhöhung der SCE-Raten um mehr als das Doppelte der Spontanrate zu erzielen (siehe LATT et al., 1981). Eine Ausnahme davon bilden S-Phase-unabhängige, Doppelstrangbrüche-induzierende mutagene Agenzien, die aber in hohem Maße strukturelle Chromosomenaberrationen induzieren (LITTLEFIELD, 1982).

Nach den vorliegenden Ergebnissen sind die erhöhten SCE-Raten aber nicht mit einer Erhöhung der Raten struktureller Chromosomenaberrationen verbunden.

In der vorliegenden Arbeit erhöhen DES, Estradiol und Progesteron die SCE-Rate nur relativ schwach.

Ähnliche Befunde wurden in der Literatur mit DES (Tabelle 2 f,g), 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), (GENTIL, 1982, Review) und Carbaryl (OENFELT und KLASTERSKA, 1984) beschrieben.

Nach KINSELLA und RADMANN (1978, 1980) schädigt TPA selbst die DNA nicht; vielmehr wird angenommen, daß TPA über eine Aktivierung von Enzymen erhöhte SCE-Raten induziert.

In diesem Zusammenhang sind auch "Modulationen" der SCE-Rate zu erwähnen. Veränderungen der SCE-Raten werden als SCE-Modulation bezeichnet, wenn Mutagen-induzierte SCEs durch Agenzien positiv oder negativ beeinflusst werden (WOLFF und MORGAN, 1982). Solche Modulationen der SCE-Rate wurden für Estradiol, Progesteron und Testosteron (BYNUM et al., 1980, 1981; DEAN et al., 1980) und für TPA (HSUEH et al., 1981) beschrieben.

Bekanntlich erhöht das Basenanalogon BUdR selbst die SCE-Rate (CARRANO et al., 1980; GUTIERREZ und CALVO, 1981; SCHVARTZMAN und TICE, 1982), so daß die erhöhten SCE-Raten nach Behandlung mit DES, Estradiol und Progesteron möglicherweise als Modulation der "BUdR-induzierten SCE-Rate" anzusehen sind.

Andere denkbare Mechanismen, die zu einer Erhöhung der SCE-Rate führen könnten, sind a) eine Beeinflussung der DNA-Replikation, (Estradiol: LEROY et al., 1975), (Modelle zur SCE-Entstehung bei der DNA-Replikation beschreiben CLEAVER (1981) und PAINTER (1982); b) ein Einfluß auf das "super-

coiling" der DNA (BYNUM et al., 1981) und c) eine Veränderung im Enzymstatus der Zelle (KINSELLA und RADMAN, 1980; NAGASAWA und LITTLE, 1981).

Weitere Hinweise, daß die Modulation der SCE-Raten nicht auf Schädigungen an der DNA beruhen, liefern Befunde, daß TPA, DES, Estradiol und Progesteron zwar zu einer Erhöhung der SCE-Raten führen, aber nicht zu einer Erhöhung der Punktmutationsraten (BARRETT et al., 1981, 1983; DREVON et al., 1981; KINSELLA und RADMAN, 1980; LANKAS et al., 1977; TROSKO et al., 1977 und Tabellen 2 und 3). Der einzige positive Befund mit DES im "mouse lymphoma assay" (CLIVE et al., 1983) ist nicht als stringenter Nachweis für Punktmutationen anzusehen, weil resistente Zellen im TK<sup>+</sup>/<sup>-</sup>-Test nicht nur auf Punktmutationen beruhen.

Anhand der Ergebnisse der eigenen Untersuchung könnte zunächst angenommen werden, daß die Induktion von SCEs nach Behandlung mit DES nicht von einer metabolischen Aktivierung abhängig ist.

Aufgrund aller weiteren zur Verfügung stehenden Informationen scheint die zellgebundene Aktivierung von DES jedoch ein entscheidender Faktor für die Induktion erhöhter SCE-Raten zu sein. In metabolisch inaktiven Zellen sind die SCE-Raten nicht erhöht. Nur in primären Zellkulturen (Humanfibroblasten und -lymphozyten), in stoffwechselaktiven permanenten Zelllinien und im "cell mediated assay" kann eine Aktivierung von DES erfolgen, nicht aber mit S9-Mix als Aktivierungssystem. Es kann vermutet werden, daß DES nur in intakten, ausreichend stoffwechselaktiven Zellen zu Metaboliten mit SCE-erhöhenden Effekten umgewandelt werden kann.

Neben der Art der metabolischen Aktivierung scheint die Dauer der Behandlung mit DES eine entscheidende Bedeutung für die Erhöhung der SCE-Raten zu haben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß bei Behandlungszeiten von bis zu sechs Stunden keine erhöhten SCE-Raten auftreten. Erhöhte SCE-Raten wurden nur gefunden, wenn die Zellen 24 Stunden oder länger mit DES behandelt wurden.

Dieser Aspekt ist bei der Beurteilung der SCE-erhöhenden Wirkung von DES bisher nicht genügend berücksichtigt worden. Überprüft man in der Literatur, bei welchen Behandlungszeiten erhöhte SCE-Raten gefunden wurden, dann ist ebenfalls festzustellen, daß die positiven Ergebnisse nur bei langen Behandlungszeiträumen mit DES erzielt worden sind.

Die Wirkungen von Estradiol und Progesteron auf die SCE-Rate sind in gleicher Weise wie für DES zu beurteilen. Der einzige Unterschied zu DES ist, daß Estradiol und Progesteron

nur nach metabolischer Aktivierung mit S9-Mix die SCE-Raten erhöhen.

#### Kontrollen

In allen Versuchserien wurden wie bei den Versuchen zum Nachweis von strukturellen Chromosomenaberrationen unbehandelte Kontrollen, Lösungsmittelkontrollen und positive Kontrollen mit Trenimon und Cyclophosphamid eingesetzt. Die SCE-Raten der unbehandelten Kontrollen entsprechen den Werten, wie sie in anderen Laboratorien unter den gleichen Kultivierungsbedingungen ermittelt wurden (CROSSEN, 1982).

Unterschiede in der SCE-Spontanrate wurden bei Kultivierung der Lymphozyten mit verschiedenen Medien festgestellt. Die in den Nullkontrollen ermittelten SCE-Raten in den Versuchen mit metabolischer Aktivierung mit Medium TC 199 (SCE+ und SCE+ Dy, 6,11 - 6,47 SCEs) und mit Medium HAM's F10 (CA+ und CA+ Dy) (4,27 - 5,05 SCEs je 100 ausgewertete Metaphasen) sind nach der statistischen Analyse im Dunnett-Test signifikant verschieden.

Es gibt Hinweise, daß nach Kultivierung in verschiedenen Medien die SCE-Spontanraten variieren (BIANCHI et al., 1979; MORGAN und CROSSEN, 1981; OBE, pers. Mitteilung). Zusammengefaßt ist die SCE-Spontanrate in den Versuchen mit HAM's F10 um etwa 1,5 SCEs niedriger als in den Versuchen mit Medium TC 199 (4,83 und 6,28 SCE/Zelle, n=400). Diese Unterschiede könnten durch die Zusammensetzung der Medien bedingt sein. Veränderungen in der Menge der Nukleoside im Kulturmedium können erhöhte SCE-Raten induzieren (PERRY, 1983).

Die Lösungsmittel, der S9-Mix, sowie die Kombination von Lösungsmittel (DMSO) und S9-Mix hatten in den hier verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf die SCE-Raten.

Die SCE-Raten der Positivkontrollen mit Trenimon („direktes“ Mutagen) entsprechen den in der Literatur angegebenen Daten (OBE und BEEK, 1979, Trenimon Review und zum Beispiel RIEDEL und OBE, 1980).

Nach Behandlung mit Cyclophosphamid („indirektes“ Mutagen) und S9-Mix waren die SCE-Raten in sehr verschiedenem Maße erhöht. Die Aktivierung von Cyclophosphamid nach Zugabe von S9-Mix im Dialyseschlauch führt insgesamt zu höheren SCE-Raten als die direkte Zugabe von S9-Mix.

Eine Ursache für die Unterschiede in den SCE-Häufigkeiten nach Aktivierung von Cyclophosphamid könnte in der Verwendung von verschiedenen Chargen S9-Fraktion liegen. Obwohl alle verwendeten Chargen von demselben Hersteller bezogen wurden, unterschieden sie sich hinsichtlich der Proteinkonzentration und der Enzymaktivität. Um in den Experimenten mit vergleichbaren S9-Konzentrationen zu arbeiten, wurde die

Proteinkonzentration des S9-Mix (mg/ml Kulturflüssigkeit) als Maßstab genommen und nicht der sonst übliche prozentuale Anteil von S9-Fraktion im Kulturmedium.

Mit einem Proteinanteil von 0,6 mg/ml S9-Fraktion im Kulturmedium (das entspricht etwa 1,3 bis 2,9 % S9-Fraktion) wurden erhöhte SCE-Raten nach Cyclophosphamidbehandlung gefunden, die aber nicht den Werten entsprachen, wie sie in der Literatur bei gleichartigen Aktivierungsbedingungen genannt sind (MADLE, 1981). In einem Versuch wurden zwei Chargen S9-Fraktion unter sonst identischen Bedingungen vergleichend getestet. Es zeigte sich, daß die beiden S9-Fraktionen bei gleichen Proteinanteilen im Kulturmedium zu Unterschieden von 100% in der Cyclophosphamid-induzierten SCE-Rate führen. Des weiteren wurde festgestellt, daß für diese S9-Chargen eine Konzentration von 0,6 mg/ml für eine optimale Aktivierung von Cyclophosphamid zu hoch war. Niedrigere Konzentrationen von S9-Fraktion hatten höhere SCE-Raten zur Folge, was auf eine bessere Aktivierung des Cyclophosphamids bei geringeren Konzentrationen S9-Fraktion schließen läßt.

MORIMOTO et al. (1983) berichten, daß einige Promutagene bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen von S9-Fraktionen optimal aktiviert werden.

Diese Resultate können verschieden gedeutet werden:

- Mit steigenden S9-Konzentrationen könnten mutagene Metaboliten vermehrt in nichtmutagene Metaboliten umgewandelt werden.
- Ein größerer Anteil der Substanzen oder der gebildeten Metaboliten könnte an Proteine des S9-Mix gebunden werden.

#### 4.3. Numerische Chromosomenaberrationen

MBC, DES und Estradiol arretierten Humanlymphozyten in der Metaphase und induzierten Mikrokerne und Polyploidien. Bei der Mehrzahl der Mikrokerne waren Chromozentren nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen, daß MBC, DES und Estradiol Genommutationen induzieren.

Veröffentlichungen zur Induktion numerischer Chromosomenaberrationen mit MBC, DES oder Steroidhormonen sind in den Tabellen 1 - 4 aufgeführt.

##### MBC

MBC arretiert die Zellen in der Metaphase und induziert Mikrokerne und Polyploidien. In den Mikrokerneln sind zu einem hohen Prozentsatz Chromozentren zu erkennen. Das kann als Hinweis darauf gewertet werden, daß MBC in Humanlymphozyten in vitro numerische Chromosomenaberrationen induziert. Chro-

mozentren entsprechen nach den Untersuchungen von BRENNER et al. (1981) dem zentromernahen Heterochromatin in den Metaphasechromosomen und sind somit ein Hinweis auf das Vorkommen von „non-disjunction“. Ein partieller Anteil von strukturellen Chromosomenaberrationen an der Mikrokernrate nach MBC-Behandlung sind aufgrund der negativen Befunde in der Chromosomenanalyse höchst unwahrscheinlich (siehe Punkt 4.1. und SEILER, 1977).

Dieses Ergebnis entspricht den Angaben in der Literatur. MBC induzierte in Pilzkulturen, an Gefäßpflanzen, im Knochenmark von Nagern und in embryonalen und permanenten Zelllinien mitotisches „non-disjunction“, Mikrokerne, mitotische Arretierung, aberrante Anaphasen oder eine Verdoppelung des DNA-Gehalts (Tabelle 1-1c).

Negative Ergebnisse werden von einem Mikrokernstest an der Maus und von zwei Dominant-Letal-Tests (DLT) an der Ratte berichtet (Tabelle 1b). Beim Mikrokernstest an der Maus ist nach dem Urteil der Autoren die intraperitoneale Verabreichung von MBC nicht die geeignete Applikationsweise. Die negativen Resultate im DLT lassen vermuten, daß MBC die Keimzellen nicht schädigt. Allerdings gilt der DLT als ein relativ unempfindliches Prüfverfahren für Mutationen (JAMES und SMITH, 1982; RUSSELL und MATTER, 1980).

Wie die Ergebnisse zeigen, überwinden die Zellen die Metaphasearretierung, ohne daß die Substanz aus den Zellen ausgewaschen werden muß. Diese Aussage kann aufgrund der Beobachtung getroffen werden, daß trotz fortlaufender Behandlung der Zellen mit MBC bereits zu einem frühen Zeitpunkt zweite Mitosen nachweisbar sind und bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M eine Polyplodierate von 100% in 2. Mitosen gefunden wird. Die beobachtete Verzögerung der Mitosefolgen beruht auf einer zeitweisen Arretierung der Chromosomen in der Metaphase. Wahrscheinlich führt der gleiche Mechanismus, der die Metaphasearretierung bewirkt, zum mitotischen non-disjunction der Chromosomen und damit zur Bildung von Mikrokernen. Mikrokerne treten bereits bei einer MBC-Konzentration auf, bei der noch keine Mitosearretierung zu beobachten ist. Polyploidien sind dagegen nur bei Konzentrationen nachweisbar, bei denen eine maximale Hemmung des Mitoseablaufs induziert wird. Es scheint deshalb eine konzentrationsabhängige Verschiebung von der Nichtverteilung einzelner Chromosomen zu der Nichtverteilung ganzer Chromosomensätze zu erfolgen.

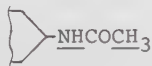
Im Vergleich zu Colcemid, das in den Versuchen zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen als positive Kon-

trolle verwendet wurde, arretiert MBC die Metaphase weniger effektiv. Die Mitoseindices erreichen nach Behandlung mit MBC nur maximal etwa 75% der Mitoseindices, wie sie nach Colcemidbehandlung gefunden werden. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich eher mit einer kürzeren Dauer der Arretierung als mit einer Verringerung der Zahl arretierter Zellen zu erklären. Im Gegensatz dazu ist mit MBC eine vollständige Induktion von Polyploidien in 2. Mitosen zu erreichen, während mit Colcemid nur etwa 2/3 der 2. Mitosen polyploidisiert sind.

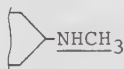
MBC ist nach diesen Resultaten als eine Substanz zu beurteilen, die verglichen mit Colcemid einen schwachen Effekt bei der Mitosearretierung hat, aber sehr effektiv Aneuploidien und Polyploidien induziert.

Der Wirkungsmechanismus von MBC ist dem von Colcemid vergleichbar und möglicherweise aus ähnlichen chemischen Strukturen heraus zu erklären. Colcemid, Colchizin, MBC und andere mitosearretierende Substanzen wie Carbaryl (OENFELT und KLASTERSKA, 1983, 1984) und einige MBC-verwandte Benzimidazolcarbamat-Derivate (HOLDEN et al., 1980) weisen Gemeinsamkeiten in der chemischen Struktur auf, da alle an aromatischen Ringsystemen ähnliche Seitenketten besitzen:

Colchizin:



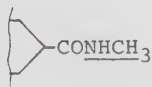
Colcemid:



MBC und  
Benzimidazolderivate:



Carbaryl:



Diese Strukturverwandtschaft läßt darauf schließen, daß ein grundsätzlich gleichartiger Mechanismus vorliegen könnte, der zur Mitosehemmung, zu Spindelstörungen und numerischen Chromosomenaberrationen führt. Colchizin inhibiert den Aufbau der Spindelfasern und es führt zur Degradation bereits

aufgebauter Spindelfasern, indem es an Tubulinproteine bindet (EIGSTI und DUSTIN, 1955; OLMSTEDT und BORISY, 1973). Ein ähnlicher Mechanismus der Mitosehemmung und der Auslösung von numerischen Chromosomenaberrationen ist auch beim MBC anzunehmen. SEILER (1977) konnte nachweisen, daß MBC an Tubulinproteine bindet und die Aggregation von Tubulinuntereinheiten inhibiert. Benzimidazolderivate, die keine entsprechende Seitenkette besitzen, wirken nicht mitosearretierend (HOLDEN et al., 1980).

#### DES

DES induziert in Humanlymphozyten numerische Chromosomenaberrationen. Die Ergebnisse aus den Versuchen zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen zeigen, daß die Behandlung mit DES arretierte Metaphasen, erhöhte Mikrokernraten als Folge von Chromosomenfehlverteilungen und Polyploidien zur Folge hat.

Der Einfluß von DES auf die Zellteilung ist bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht und an verschiedenen Testsystemen nachgewiesen worden. In der Literatur wurden mitosearretierende Wirkungen und aberrante Anaphasen nach Behandlung mit DES beschrieben (DRUCKREY et al., 1952; KUCHLER und GRAUER, 1962; RAO und ENGELBERG, 1967; Tabellen 2 g,h). Der Einfluß von DES auf den Spindelapparat wurde auch an Primärkulturen von Humanfibroblasten nachgewiesen (2f,h). Untersuchungen zum Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen durch DES ergaben demgegenüber kein einheitliches Bild. DES induzierte in HeLa-Zellen eine Vergrößerung der Zellkerne, nicht aber in Fibroblasten (Tabelle 2). An Pilzkulturen wurde untersucht, ob DES meiotisches oder mitotisches „non-disjunction“ induziert; die berichteten Ergebnisse sind widersprüchlich (Tabelle 2 c). Untersuchungen an Säugern im DLT, im MNT und die Auswertung von Knochenmarkszellen auf Hypo- und Hyperploidien führten ebenfalls zu widersprüchlichen Ergebnissen (Tabelle 2 e,f). In Zellkulturen wurden außer Zellteilungsstörungen auch Polyploidien festgestellt, aussagekräftige quantitative Analysen wurden aber nicht durchgeführt (Tabelle 2g,h).

PARRY et al. (1982) untersuchten die Effekte von DES auf die Mitose und fanden im gleichen Konzentrationsbereich (etwa  $5 \times 10^{-5}$  M bis  $1 \times 10^{-4}$  M) nahezu identische Erhöhungen der Mitoserate, wie sie in dieser Arbeit ermittelt wurden. DES erhöht die Mitoserate nicht im gleichen Maß wie Colcemid; bei einer kurzen Behandlungsdauer haben die Mitosen aber das gleiche Erscheinungsbild (C-Metaphasen).

Nach den vorhandenen Informationen in der Literatur sind im MNT keine (CHRISMAN und BAUMGARTNER, 1979; KIRKHART, 1981; MOLINA et al., 1978; TSUCHIMOTO und MATTER, 1981) oder nur schwach positive (SALAMONE et al., 1981) Erhöhungen der Mikrokernraten nach DES-Behandlung gefunden worden. Diese Ergebnisse scheinen ungewöhnlich, weil die beobachteten Zellteilungsstörungen und der Nachweis von Aneuploidien in anderen Testsystemen eine Induktion von Mikrokernen erwarten läßt.

In der vorliegenden Arbeit wurden deutlich erhöhte Mikrokernraten (von 0,4 auf etwa 10%) infolge der DES-Behandlung nachgewiesen. Die Mehrzahl der Mikrokernkerne sind von Chromosomenfehlverteilungen abzuleiten.

Ergebnisse, die mit in vitro-Systemen erzielt worden sind, können nicht unbedingt mit Ergebnissen aus in vivo-Studien, wie dem MNT an der Maus, verglichen werden. Die eindrucksvollen Unterschiede im Nachweis von DES-induzierten Mikrokernen zwischen dem MNT in vivo und dem MNT in vitro sind jedoch möglicherweise sehr einfach zu erklären:

DES bzw. DES-diphosphat wurde in allen MNT an der Maus i.p. appliziert. Aufgrund der Löslichkeitseigenschaften von DES, die denen von MBC gleichen, ist aber anzunehmen, daß diese Behandlungsform wie beim MBC unangemessen ist (siehe dazu Punkt 4.3., numerische Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit MBC und SEILER, 1976).

Ebenfalls eindeutig positive Ergebnisse wurden in dieser Arbeit mit der Analyse von Polyploidien erzielt. In der Literatur wurden Polyploidien in Säugerzellen als Folge der Behandlung mit DES zwar regelmäßig beschrieben, es wurden aber keine speziellen Tests durchgeführt. Quantitativ wurde die Erhöhung der Polyploidierate bisher nur in einem inadäquaten Testsystem (SCE-Test) untersucht (HILL und WOLFF, 1982, 1983). Diese Autoren fanden eine geringfügige Erhöhung der Polyploidierate gegenüber der Spontanrate. In der vorliegenden Arbeit wurde die Polyploidierate an der Gesamtmitoserate nach verschieden langen Behandlungsintervallen ausgewertet. Unter diesen Bedingungen liegen nach einer Behandlungsdauer von 44 Stunden noch keine absicherbaren Erhöhungen der Polyploidierate vor. Erst nach einer Behandlungsdauer von 56 und 72 Stunden ist die Induktion von Polyploidien nachzuweisen. Die Polyploidieraten sind um das 2- bis 10-fache höher, als die von HILL und WOLFF (1982, 1983) genannten Raten.

Zweite und nachfolgende Mitosen machen nur einen Bruchteil der Mitoserate aus, weil ein hoher Anteil der Zellen in der 1. Mitose arretiert bleibt. Deshalb ist der Nachweis von induzierten Polyploidien eindeutiger, wenn der Ploidiegrad nur in 2. und 3. Mitosen nach der Behandlung bestimmt wird. Bei

der Auswertung der 2. Mitosen werden nach 30-stündiger DES-Behandlung bis zu 3,3% und nach 50 Stunden bis zu 35% polyploide Mitosen gefunden. Diese Werte sind im Gegensatz zu den Ergebnissen in der Literatur deutlich erhöht, womit gezeigt wurde, daß DES in Zellkulturen sehr effektiv Polyploidien induziert.

DES erhöht im Vergleich zu Colcemid weniger effektiv die Mitoserate und induziert nur etwa halb so viele Polyploidien. In der höchsten DES-Konzentration ist nach 30- und 50-stündiger Behandlung die Proliferation in der gleichen Weise verzögert wie nach Colcemidbehandlung. Mit DES scheint aber das Eintreten von polyploiden Zellen in die 2. Mitose im Vergleich zu Colcemid weiter verzögert zu sein, weil ein relativ hoher Anteil polyploider Mitosen erst nach einer längeren Behandlungsdauer gefunden wird als bei Colcemid.

Diese Relationen weisen darauf hin, daß DES nicht so spezifisch auf die Zellteilung einwirkt wie Colcemid. Nach DES-Behandlung scheinen weniger Zellen in der Metaphase arretiert, diese aber stärker in der Mitose verzögert zu sein als nach Colcemidbehandlung. Für DES muß auch eine Verzögerung der Proliferation in der nachfolgenden Interphase in Betracht gezogen werden (CLEAVER und PAINTER, 1975; RAO, 1969).

DES hat in der Arretierung der Metaphase und in der Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen somit ein anderes Wirkungsspektrum als Colcemid. PARRY et al. (1982) konnten zeigen, daß DES auf den Spindelapparat einwirkt. DES führt zu einer Verkürzung der Metaphasespindeln und inhibiert in höheren Konzentrationen den Aufbau von Spindelfasern. Dafür sind zwei Mechanismen als Erklärungsmöglichkeiten naheliegend:

- a) - die Bindung von DES an Tubulinproteine
- b) - der Einfluß von DES auf die intrazelluläre Konzentration von Calciumionen

zu a): Die Bindung von DES an Tubulinproteine ist noch nicht untersucht. Eine derartige Wirkung kann aber angenommen werden, denn es ist bekannt, daß DES unspezifisch und in hohem Maß Proteinbindungen eingeht (CLIVE et al., 1983; MURAKAMI und FUKAMI, 1983).

zu b): Die Bedeutung der Calciumionenkonzentration in der Zelle für den Auf- und Abbau von Spindelfasern und somit für den geregelten Ablauf der Mitose haben BAJER und MOLE-BAJER, 1972; BEATTY, 1957; EIGSTI und DUSTIN, 1955; NAGL, 1976; RIEGER, 1963; WEGNER, 1979) beschrieben. Es gibt Anzeichen

dafür, daß unter DES-Einwirkung die Calciumregulation der Zelle gestört ist. Die Ergebnisse hinsichtlich der Metaphasearretierung und der Induktion von Mikrokernen und Polyploidien sind nach DES- und Estradiolbehandlung nahezu gleich. Für Estradiol muß sowohl eine proteinbindende Wirkung angenommen werden als auch eine Beeinflussung der Calciumionenkonzentration (siehe 4.3., Estradiol).

DES hat mit Colcemid keine Ähnlichkeiten in der chemischen Struktur, wie sie zuvor für MBC beschrieben wurde. Vielmehr hat DES wie einige andere Mitosegifte eine hohe Lipidlöslichkeit (EIGSTI und DUSTIN, 1955; HENRICH et al., 1980).

### Estradiol

Estradiol arretiert die Zellen in der Metaphase, induziert Mikrokerne infolge von Chromosomenfehlverteilungen und Polyploidien. Die Ergebnisse entsprechen weitgehend den Resultaten mit DES. Damit ist nachgewiesen, daß Estradiol in Humanlymphozyten in vitro numerische Chromosomenaberrationen induziert.

Dieses Ergebnis bestätigt Untersuchungen an menschlichen Synovialzellen (Hyperploidien), an Schweineoozyten in vitro und an HeLa-Zellen, in denen mitotisches non-disjunction, Spindelstörungen, Aneuploidien und Mikrokerne beschrieben wurden (Tabelle 3 b,c).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß Estradiol den Mitoseindex und die Mikrokernrate etwa in gleichem Maße erhöht, wie DES. Polyploide Zellen treten ebenfalls verzögert in die zweite Mitose ein. Die höchste Polyploidierate liegt im Vergleich zu Colcemid bei 25% und im Vergleich zu DES bei 50%. Zum Nachweis von Mikrokernen und Polyploidien sind bei Estradiol etwas höhere Konzentrationen als bei DES nötig. Das Potential von Estradiol zur Induktion von Genommutationen ist also vergleichsweise schwach.

In anderen, weniger sensitiven Tests zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen, wurden mit Estradiol bei der Bestimmung der Chromosomenzahl widersprüchliche Ergebnisse (LYCETTE et al., 1970,1973) oder bei der Bestimmung des Ploidiegrades negative Ergebnisse (HILL und WOLFF, 1983) erzielt.

Als Ursache für Spindelstörungen müssen wie bei DES Bindungen von Estradiol an Tubulinproteine und Estradiol-bedingte Veränderungen in der Calciumionenkonzentration der Zelle in Betracht gezogen werden.

Estradiol hat eine hohe Bindungskapazität an Proteine (MURA-

KAMI und FUKAMI, 1983) und wahrscheinlich auch an Tubulinproteine. FILATSCHEVA (1969) konnte zeigen, daß "parachlormercuribenzoic acid", das Bindungen an Sulfhydrylgruppen inhibiert, den mitostatischen Effekt von Estradiol reduziert.

RAO (1969) und SMITH et al. (1975) beschrieben den Einfluß von Estradiol auf die Calciumionenkonzentration. Calcium und Estradiol wirken als mitoseverzögernde Substanzen antagonistisch. Jede Substanz für sich induziert einen Mitoseblock. Estradiol hebt den mit Calciumionen induzierten Mitoseblock wieder auf und umgekehrt.

Eine mögliche Erklärung für veränderte Calciumionenkonzentrationen ist eine Wechselwirkung von chemischen Agenzien mit Membraneigenschaften der Zellen (siehe dazu WEGNER, 1979).

In diesem Zusammenhang ist die Überlegung einiger Autoren interessant, daß Steroidhormone die Membraneigenschaften von Zellen verändern könnten (BLEWITT et al., 1983; KUCHLER und GRAUER, 1962 und KUCHLER et al., 1962). SEROVA und KERKIS (1974) beobachteten, daß in Zellkulturen Steroidhormone zu unvollständigen Mitosen und „verstreuten Chromosomen“ führen und erklären das mit einer Destabilisierung der Zellmembran.

#### Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon

Diese natürlich vorkommenden Steroidhormone führten bei einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M nicht zu einer Erhöhung der Mitoseraten und es wurden keine C-Metaphasen gefunden; sie wurden nicht auf die Induktion von Mikrokernen und Polyploidien untersucht.

Diese Steroide sind bisher kaum auf ihre mögliche Fähigkeit, numerische Chromosomenaberrationen zu induzieren, untersucht (3 a- c). Progesteron und Testosteron binden geringfügig und deutlich schwächer als DES und Estradiol an Proteine (MURAKAMI und FUKAMI, 1983). Für Progesteron existieren Hinweise auf die Induktion von numerischen Aberrationen. In Schweineoocyten wirkte Progesteron ähnlich wie Estradiol und an Keimzellen von männlichen Hunden wurden aberrante meiotische Teilungen beobachtet. Mit Estron und Testosteron konnte kein Einfluß auf die Mitose festgestellt werden (LYCETTE et al., 1970; MC GAUGHEY, 1977; RAO und ENGELBERG, 1967; WILLIAMS et al., 1968, 1971).

Obwohl diese Steroidhormone den Mitoseindex nicht erhöhen, kann eine Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen nicht ausgeschlossen werden.

## Kontrollen

In den Versuchen zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen wurden mit den Lösungsmittelkontrollen (DMSO) keine erhöhten Mitoseindices, Mikrokern- und Polyploidieraten gegenüber den unbehandelten Kontrollen gefunden (siehe auch: TRAUT, 1983). Colcemid als Positivkontrolle erwies sich als wirksamste mitosearretierende Substanz, induziert aber nicht so viele Polyploidien wie MBC. Endoreduplikationen waren in allen Präparaten nach langen Behandlungszeiten gehäuft zu finden und sind deshalb nicht als Substanzeffekt, sondern als Folge von langen Kultivierungszeiten ohne Medienwechsel einzuordnen.

### 4.3.1. Der Nachweis von induzierten numerischen Chromosomenaberrationen in Lymphozytenkulturen

Untersuchungen zur Mitosearretierung und Polyploidie ergänzen die Beurteilung der Ergebnisse aus der Mikrokernanalyse. Die hohe Nachweisempfindlichkeit von numerischen Chromosomenaberrationen bei dieser Auswertung wird in der nachfolgenden Übersicht deutlich (siehe Tabelle 62).

TABELLE 62:

Ergebnisübersicht für die relative Wirkung der Substanzen auf die Mitose, Mikrokern- und Polyploidierate. Für jede Substanz ist die im Test optimal wirksame Konzentration aufgeführt. Die Pluszeichen sind ein relatives Maß der Metaphasearretierung, Mikrokerninduktion und Polyploidisierung. Es bedeutet: + + + starke Wirkung, + + mittlere Wirkung und + schwache Wirkung

|                           | Colcemid<br>$2 \times 10^{-7}$ | MBC<br>$5 \times 10^{-5}$ | DES<br>$1 \times 10^{-4}$ | Estradiol<br>$1 \times 10^{-4}$ M |
|---------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Metaphase-<br>arretierung | + + +                          | + +                       | + +                       | + +                               |
| Mikrokern-<br>bildung     | + + +                          | + + +                     | + +                       | + +                               |
| Polyploidie               | + +                            | + + +                     | +                         | +                                 |

Die Durchführung der Versuche mit Humanlymphozyten hat den Vorteil, daß die Lymphozyten im ersten Zellzyklus noch rela-

tiv synchron wachsen und deshalb ohne Maßnahmen zur Zellsynchronisation speziell zum Zeitpunkt der Zellteilung behandelt werden können. Die Versuche wurden deshalb unabhängig von den Experimenten zur Chromosomen- und SCE-Analyse durchgeführt. Die Behandlungen erfolgten ohne Zugabe von Colcemid, das in diesen Versuchen nur als Kontrolle eingesetzt wurde. Unter diesen Bedingungen führen Verzögerungen in der Mitose zu erhöhten Mitoseraten und bei Colcemid-ähnlichen Effekten sind C-Metaphasen nachzuweisen. Nach Überwindung der Mitosehemmung (und bei noch nicht nachweisbarer Mitosehemmung in niedrigeren Substanzkonzentrationen) sind in der nachfolgenden Interphase Mikrokerne und bei längerer Kultivierungsdauer Polyploidien nachweisbar. Zur Auswertung von Polyploidien ist eine differentielle Chromatidenanfärbung zu empfehlen, um die Polyploidierate nur in 2. Mitosen ermitteln zu können.

Mit anderen Behandlungsschemata, bei denen in Verbindung mit Chromosomen- und SCE-Analysen Aussagen über die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen gemacht wurden, sind negative Ergebnisse berichtet worden. Die Behandlung in anderen Zellzyklusstadien läßt keine gesicherte Aussage auf die Wirkungen von Substanzen in der Mitose zu, weil eine verminderte Reaktion der Lymphozyten auf die PHA-Stimulation (FITZGERALD et al., 1973) und eine Verzögerung von Interphasestadien (CLEAVER und PAINTER, 1975; RAO, 1969) eine Reduktion der Mitoseraten bewirken. Unter diesem Gesichtspunkt sind auch Untersuchungen zu sehen, in denen nach Behandlung mit Estrogenen, die in dieser Untersuchung die Metaphase arretieren, eine Reduzierung der Mitoserate gefunden wurde (FITZGERALD et al., 1973; MORISHIMA und HENRICH, 1974). Die selben Gründe können für die negativen Ergebnisse bei der Auswertung von Aneuploidien (IVETT und TICE, 1981; LYCETTE et al., 1973) und Polyploidien (HILL und WOLFF, 1983) verantwortlich sein.

Von den untersuchten Endpunkten sind bei allen geprüften Substanzen Mikrokerne bei niedrigeren Substanzkonzentrationen nachweisbar als Mitoseverzögerungen und Polyploidien. In Tabelle 63 (siehe Seite 121) ist das am Beispiel von MBC dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß die in dieser Arbeit angewandte Behandlungsvariante und die Auswertung der Mitose-, Mikrokern- und Polyploidieraten einen sensitiven Nachweis von induzierten numerischen Chromosomenaberrationen an Humanlymphozyten ermöglicht. Dieses Verfahren hat gegenüber anderen Testsystemen den Vorteil, daß die untersuchten Endpunkte einfacher und schneller zu analysieren sind und verlässli-

chere Resultate liefern als die Auszählung der Chromosomenzahlen zur direkten Bestimmung von Aneuploidieraten. Das Bestimmen der Chromosomenzahlen ist sehr zeitaufwendig und weniger verlässlich als die zuvor beschriebene Methode, weil Aufarbeitungsartefakte und andere Faktoren (beispielsweise eine Destabilisierung der Zellmembran) zu fehlerhaften Ergebnissen führen können.

TABELLE 63:

Wirksame Konzentrationen, die bei Behandlung von Lymphozyten mit MBC zur Arretierung der Metaphase, erhöhten Mikrokern- und Polyploidieraten führen. Die Minus- und Pluszeichen geben den Effekt von MBC auf den jeweiligen Endpunkt an. Es bedeuten: -: kein Effekt, +: schwacher Effekt, ++: mittlerer Effekt, +++: starker Effekt; n.g.: nicht getestet

| MBC-Konzentration    | Mitoseindex | Mikrokern | Polyploidien |
|----------------------|-------------|-----------|--------------|
| $1 \times 10^{-6}$ M | -           | +         | n.g.         |
| $5 \times 10^{-6}$ M | +           | +         | n.g.         |
| $1 \times 10^{-5}$ M | ++          | ++        | +            |
| $5 \times 10^{-5}$ M | ++          | +++       | +++          |

#### 4.4. Schlußbetrachtung

Die vorliegenden Ergebnisse liefern keine Hinweise darauf, daß die Testsubstanzen Mutationen induzieren, die auf einer direkten Interaktion mit der DNA beruhen. Die leichte Erhöhung der SCE-Raten, wie sie nach Behandlung mit DES, Estradiol und Progesteron gefunden wurden, können nicht eindeutig als Schädigungen der DNA angesehen werden (siehe Punkt 4.2. der Diskussion).

Ein gemeinsames Charakteristikum für drei der sieben untersuchten Substanzen (MBC, DES und Estradiol) ist die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen und es stellt sich die Frage, welche Bedeutung diese im in vitro-Versuch gewonnenen Ergebnisse haben.

Numerisch aberrante Zellen (Aneuploidien und Polyploidien)

haben in Zellkulturen die gleiche Überlebensdauer wie diploide Zellen (THOMPSON und HOLLIDAY, 1978; OENFELT und KLASTERSKA, 1983). Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß numerische Chromosomenaberrationen auch in Somazellen und in Zellen der Keimbahn in vivo induziert werden und erhalten bleiben.

Die Induktion von Aneuploidien und Polyploidien in Keimzellen hätte eine erhöhte Infertilitätsrate, ein gehäuftes Auftreten von Spontanaborten und eine erhöhte Geburtenrate mit trisomen Nachkommen zur Folge (HOOK und PORTER, 1977; SANKARANARAYANAN, 1979).

Die Bedeutung von numerischen Chromosomenaberrationen in Somazellen ist unbekannt, aus zahlreichen Veröffentlichungen geht aber hervor, daß numerische Chromosomenaberrationen neben anderen Faktoren an der Promotion von Tumoren beteiligt sein könnten. Es wird diskutiert, daß präneoplastische Läsionen, die allein noch nicht zu einer Transformation der Zelle führen, durch Chromosomenfehlverteilungen zur Expression gelangen und so eine Transformation der Zelle erfolgen kann (BARRETT et al., 1981, 1983; KINSELLA und RADMAN, 1980; OENFELT und KLASTERSKA, 1984).

Untersuchungen mit TPA und anderen Tumorpromotoren haben ergeben, daß diese Substanzen numerische Chromosomenaberrationen induzieren (EMERIT und CERUTTI, 1981, PARRY et al., 1981). In einigen Veröffentlichungen wird auf die Möglichkeit hingewiesen, daß eine veränderte Chromosomenzahl zu der Entwicklung von Neoplasien führen kann (HOFFMAN et al., 1979; KLEIN, 1981) und es sind Tumoren mit spezifischen Trisomien gefunden worden (BISHOP, 1982; KRÄMMER, 1982; YUNIS, 1983).

Es gibt Überlegungen, daß bei einigen Substanzen ein Zusammenhang zwischen Tumorpromotion und einer leichten Erhöhung der SCE-Rate besteht (GENTIL, 1982, Review; KINSELLA und RADMAN, 1980).

Unter diesen Aspekten ist die Beurteilung der Ergebnisse mit MBC, DES und Estradiol wie folgt vorzunehmen.

#### MBC

Nach den vorliegenden Untersuchungen sind mit MBC keine Mutationen nachzuweisen, die auf eine Schädigung der DNA schließen lassen. Es ist aber bekannt, daß MBC als Basenanalogon Basenpaarsubstitutionen bewirkt und so in sehr spezieller Weise Punktmutationen induziert (DASSENIOY und MEYER, 1973; KAPPAS et al., 1976; SEILER, 1972). Des weiteren ist

die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen in der vorliegenden Untersuchung und in einer Reihe von Veröffentlichungen (Tabelle 1 - 1c) eindeutig belegt. SEILER (1977) hat bei seinen Untersuchungen mit MBC festgestellt, daß im Mikrokerntest an der Maus in vivo die niedrigste wirksame Dosis im Bereich von etwa  $5 \times 10^{-5}$  M lag und in der gleichen Konzentration konnte die Inhibition der Zusammenlagerung von Tubulinuntereinheiten nachgewiesen werden. Nach den Ergebnissen der vorliegenden in vitro-Studien induziert MBC aber schon bei einer Konzentration von etwa  $5 \times 10^{-6}$  M Mikrokerne und eine Hemmung der Mitose. Diese Konzentration liegt um das 10-fache unter der von SEILER (1977) angenommenen Schwellendosis.

Unbekannt ist, ob MBC in Keimzellen Mutationen oder Chromosomenfehlverteilungen induziert. Es ist jedoch erwiesen, daß MBC im Tierversuch kanzerogen ist und die Rate an Lebertumoren erhöht (SALMINEN und KIVELÄ-IKONEN, 1982).

#### DES

Für die krebserregende Wirkung von DES wurde ein ursächlich krebbsauslösender Mechanismus (Tumorinitiation) angenommen. DES erwies sich aber in Mutagenitätstests zum Nachweis von Gen- und Chromosomenmutationen als wirkungslos.

Die Vermutung, daß DES kein ultimates Mutagen ist, sondern erst nach Verstoffwechselung in mutagene Metaboliten überführt werden muß, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Versuche mit DES-Metaboliten auf die Induktion von Punktmutationen ergaben dafür ebenfalls keinen eindeutigen Hinweis (GLATT et al., 1979, 1980, 1983; METZLER und MC LACHLAN, 1979; RÜDIGER et al., 1979).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß DES numerische Chromosomenaberrationen induziert.

Bereits aus anderen Untersuchungen ergab sich der Verdacht, daß DES Chromosomenfehlverteilungen verursacht und diese in Beziehung zu der Entwicklung von Tumoren stehen. Einen Zusammenhang zwischen der Induktion von Aneuploidien und der Tumorpromotion durch DES vermuteten BARRETT et al. (1981, 1983); DANFORD und PARRY (1982) HILL und WOLFF (1983) und PARRY et al. (1981).

Klinische Studien zeigen, daß vaginale zelluläre Dysplasien bei jungen Frauen auftreten, die pränatal der Wirkung von DES ausgesetzt waren. Die Zellen dieser Gewebe sind aneuploid und/oder polyploid. Diese numerisch aberranten präneoplastischen Veränderungen sind nach der Pubertät anfällig für die Bildung von Tumoren, deren Zellen ebenfalls numerisch aberrant sind (FU et al., 1979 a,b)

DES wirkt in Geweben (Mamma, weiblicher Genitaltrakt, Leber)

kanzerogen, in denen DES akkumuliert wird und in denen eine erhöhte Zellproliferation stattfindet. DES unterliegt in der Leber einem enterohepatischen Kreislauf und wird dort durch Bindung an subzelluläre Proteinfractionen angereichert. In den Geweben des weiblichen Genitaltrakts wird eine Akkumulation durch Estradiolrezeptoren angenommen und es konnte gezeigt werden, daß DES im unteren Abdominalbereich von Feten konzentriert wird. Unter diesen Voraussetzungen kann davon ausgegangen werden, daß sich in diesen Geweben DES-Konzentrationen einstellen können, die den Konzentrationen in der vorliegenden Untersuchung entsprechen und mit denen numerische Chromosomenaberrationen induziert wurden.

Wie beim Menschen führt DES auch im Tierversuch bei Behandlung in der proliferativen Phase des reproduktiven Apparats nach der Geschlechtsreife zur Ausbildung von Tumoren. Einige weitere Hinweise auf die Tumorpromotion von DES lieferten Tierversuche, in denen DES in Verbindung mit Tumorstämmen die Rate an Mammatumoren erhöhte, DES oder die Tumorstämme allein aber keinen Effekt auf die Krebsrate hatten. Die Behandlung von Ratten mit DES vor oder nach einmaliger Applikation von Dimethylbenzanthrazen (DMBA) führte ebenfalls zu höheren Tumorraten als DMBA allein.

(siehe Übersichtsarbeit von BRIGGS und BRIGGS, 1981 und bei TAUBERT und KUHLE, 1981).

Die kanzerogenen Eigenschaften von DES konnten mit Kurzzeittests nur im Transformationstest bestätigt werden, in Versuchen zum Nachweis von genotoxischen Wirkungen sind DES und seine Metabolite negativ oder fraglich positiv. Die Frage, ob DES Schädigungen an der DNA induziert muß deshalb offen bleiben.

Numerische Chromosomenaberrationen werden bei der Beurteilung genotoxischer Wirkungen meistens nicht berücksichtigt. Numerische Chromosomenaberrationen sind nach der Hypothese von KINSELLA und RADMANN (1980) einer der Mechanismen, mit dem eine Tumorpromotion zu erklären ist.

In der vorliegenden Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß DES numerische Chromosomenaberrationen induziert. Es ist deshalb nicht auszuschließen, daß die kanzerogenen Eigenschaften von DES auf diesem Mechanismus beruhen.

Die Frage nach einer Induktion von Aneuploidien in Keimzellen durch DES kann nicht beantwortet werden; hierzu liegen keine Untersuchungen vor.

Für Estradiol wurde im Tierversuch eine kanzerogene Wirkung beschrieben (Mamma, Ovarien und Leber), (BRIGGS und BRIGGS,

1981), in anderen Studien wurden dagegen protektive Effekte gefunden (siehe dazu: HUSMANN, 1970; KAISER, 1971, MC KERNS, 1974).

Eine primäre Induktion von Krebs konnte mit Steroidhormonen nicht nachgewiesen werden (SCHUPPLER und GÜNZEL, 1979), vielmehr wurde eine Promotion von Tumoren festgestellt (SCHUPPLER et al., 1982, 1983; TAPER, 1978; YAGER und YAGER, 1980).

Die Befunde, daß Hormone nicht primär Krebs induzieren, decken sich mit den Resultaten der Mutagenitätstests. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und den Angaben in der Literatur (Tabellen 3 und 4) induzieren Steroidhormone keine Gen- oder Chromosomenmutationen. Wechselwirkungen der Steroide mit der DNA sind nicht bekannt.

Der einzige deutliche Effekt eines Steroidhormons auf die Induktion von Mutationen wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Nachweis von Estradiol-induzierten numerischen Chromosomenaberrationen gefunden.

Die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen könnte eine Erklärung für die tumorpromovierenden Eigenschaften von Estrogenen sein.

Damit stimmen Befunde überein, daß in Steroidhormon-induzierten Tumoren Aneuploidien nachzuweisen sind (HILF und WITTLIFF, 1974; MOYLE und GREEP, 1974).

Möglicherweise kommt Hormonen auch eine Bedeutung für die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen in den Keimzellen zu.

Estradiol, das natürlich vorkommende weibliche Sexualhormon induziert nach den Ergebnissen dieser Studie Chromosomenfehlverteilungen. Obwohl diese Eigenschaft von Estradiol erst in Konzentrationen ab  $5 \times 10^{-5}$  M in Lymphozyten nachzuweisen ist und im Körper unter normalen physiologischen Bedingungen wesentlich niedrigere Konzentrationen im Blutplasma und in den Sexualorganen vorliegen (etwa  $10^{-10}$  M), kann doch vermutet werden, daß unter bestimmten Bedingungen in hormonrezeptiven Geweben die Konzentrationen um ein Vielfaches höher sind. So wurden bei der Verabreichung von Steroidhormonen (Sequenzpräparate OC) im Endometrium mittlere Konzentrationen bis zu 5,89 mg/kg Ethinylestradiol gemessen, im Blutplasma dagegen nur bis zu 1,05 µg/l (das entspricht Konzentrationen von etwa  $2 \times 10^{-5}$  M im Endometrium und  $3 \times 10^{-9}$  M im Blutplasma), (BRIGGS und BRIGGS 1981)

Unter diesem Aspekt ist zu bedenken, daß bereits CARR (1967, 1970) erhöhte Raten spontaner Aborte mit aneuploiden und polyploiden Karyotypen gefunden hat, wenn Frauen vor der

Schwangerschaft hormonale Kontrazeptiva eingenommen hatten. Einen leichten Anstieg der Häufigkeit von Trisomien bei Kindern von Müttern, die hormonale Kontrazeptiva eingenommen hatten, fanden BISHUN et al. (1975) und NIELSEN et al. (1982).

Die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen durch natürlich vorkommende Sexualhormone (Estradiol) ist möglicherweise eine Erklärung dafür, daß die Häufigkeit von Trisomien mit dem Alter der Mutter zunimmt.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Das Fungizid Methylbenzimidazol-2-carbamoyl (MBC), das künstliche Estrogen Diethylstilbestrol (DES), sowie die natürlich vorkommenden Steroidhormone Estradiol, Estron, Progesteron, Testosteron und Androstanolon wurden im menschlichen Leukozyten-Testsystem in vitro auf die Fähigkeit zur Induktion von strukturellen Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustauschen (SCE) untersucht.

Alle Substanzen wurden ohne und mit exogener metabolischer Aktivierung überprüft. Als Aktivierungssystem diente der S9-Mix Arochlor-induzierter Rattenlebern. Die Aktivierung erfolgte nach zwei Behandlungsschemata: a) direkte Zugabe des S9-Mix zu den Blutkulturen und b) Zugabe des S9-Mix zu den Kulturen im Dialyseschlauch. Die Substanzen wurden in einem Konzentrationsbereich von  $1 \times 10^{-8}$  M bis  $1 \times 10^{-3}$  M getestet. Die Behandlungsdauer mit den Testsubstanzen erstreckte sich je nach Versuchsansatz über 1 bis 24 Stunden.

2. Mit keiner der sieben Substanzen war weder mit noch ohne metabolische Aktivierung eine signifikante Erhöhung der Raten struktureller Chromosomenaberrationen zu erzielen. Bei den höchsten getesteten Konzentrationen im Bereich der Löslichkeitsgrenze für die Substanzen in DMSO wurden für die Hormone zytotoxische Effekte beobachtet, die zur Hämolyse der Kulturen führten. Positivkontrollen mit Trenimon und Cyclophosphamid führten zu statistisch signifikanten Erhöhungen der Aberrationsraten.

3. Die SCE-Rate ist ohne metabolische Aktivierung nur nach Langzeitbehandlung mit DES erhöht. Unter Einbeziehung der metabolischen Aktivierung induzieren nach Langzeitbehandlung (24 - 48 Std.) DES, Estradiol und Progesteron erhöhte SCE-Raten. Die SCE-Rate ist maximal verdoppelt und liegt im Grenzbereich der Signifikanz im Dunnett-Test bei einem p von 0,05. Die Erhöhung der SCE-Raten auf maximal eine Verdoppelung der Grundraten sind reproduzierbar. Alle anderen Substanzen (MBC, Estron, Testosteron und Androstanolon) haben keinen nachweisbaren Einfluß auf die SCE-Rate. Die Kurzzeitbehandlung (1 - 6 Std.) mit den Testsubstanzen erhöht die SCE-Rate nicht.

4. Die Bedeutung der Erhöhung der SCE-Raten durch DES, Estradiol und Progesteron nach Langzeitbehandlung ohne, bzw. mit Aktivierung durch Leberenzyme wird diskutiert. Es müssen zwei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden: a) die Substanzen werden nur unzureichend aktiviert, oder b) die er-

höhten SCE-Raten sind nicht durch direkte Einwirkungen auf die DNA bedingt.

5. Alle Testsubstanzen wurden auf die Fähigkeit untersucht, Mitosen zu arretieren. Die Substanzen MBC, DES und Estradiol erhöhen bei der getesteten Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M den Mitoseindex, wenn sie wie Colcemid vier Stunden vor Aufarbeitung (nach 48 Stunden), zum Zeitpunkt des 1. Mitosemaximums, den Blutkulturen zugegeben werden. Die arretierten Mitosen haben das Aussehen von C-Metaphasen.

6. Das Testsystem mit Humanlymphozyten wurde zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen verwendet. Dazu wurden die Versuchsbedingungen und Behandlungsschemata entsprechend der Fragestellung zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen angepaßt. Die Substanzzugabe erfolgte unmittelbar vor dem Maximum der 1. Mitosen nach 40 Stunden, die Aufarbeitungszeitpunkte variierten von 68 bis 112 Stunden nach Kulturbeginn. Als Nachweis für die Induktion von numerischen Chromosomenaberrationen wurden Mikrokerne in Interphasen ausgewertet. Durch C-Bandenfärbung konnte betätigt werden, daß die Chromozentren in Interphasekernen identisch mit den C-Banden in Metaphasechromosomen sind. Hohe Anteile von Chromozentren in Mikrokernen sind ein Hinweis, daß diese Mikrokerne durch Zellteilungsstörungen induziert wurden und nicht von strukturellen Chromosomenaberrationen. Mit verlängerter Kultivierungsdauer sind Polyploidien nachweisbar. Der prozentuale Anteil an Polyploidien in 2. und 3. Mitosen kann durch die differentielle Anfärbung der Schwesterchromatiden (SCE-Färbung) ermittelt werden.

7. Die Resultate zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen zeigen, daß das angewendete Behandlungsschema und die Auswertung von Mikrokernen, Heterochromatin in Mikrokernen und Polyploidien einen wirkungsvollen Nachweis von Genommutationen ermöglicht.

MBC ist eine Substanz, von der aus anderen Kurzzeittests schon die Fähigkeit bekannt war, Zellteilungsstörungen, numerische Chromosomenaberrationen (mitotisches non-disjunction) und Mikrokerne zu induzieren. Die Induktion hoher Mikrokernraten durch MBC ist eindeutig auf Fehlverteilungen von Chromosomen in der Zellteilung zurückzuführen. Diese Auffassung wird auch durch die hohen Anteile von Chromozentren in Mikrokernen betätigt. MBC führt bei Lymphozyten zu hohen Anteilen polyploider Metaphasen in den nachfolgenden Zellteilungen (bis zu 100 % in 2. und 3. Mitosen).

8. DES und Estradiol induzieren unter den beschriebenen Testbedingungen gleichfalls numerische Chromosomenaberrationen. Diese Hormone erhöhen die Mikrokernrate auf bis zu 12 %. Für diese Substanzen trifft in gleicher Weise zu, daß keine erhöhten Raten struktureller Chromosomenaberrationen induziert werden, aber in einem großen Anteil der Mikrokerne Chromozentren nachweisbar sind (über 50 %). Die Polyploidierate ist gegenüber unbehandelten Kontrollen ebenfalls stark erhöht, aber geringer als nach Behandlung mit MBC. Nach Behandlung mit DES sind bis zu 35,1 % und mit Estradiol bis zu 16,5 % der 2. und 3. Mitosen polyploid.

## 6. LITERATUR

- ABDEL-FADIL, M.R., C.G. PALMER, N. HEEREMA: Effect of temperature variation on sister-chromatid exchange and cell-cycle duration in cultured human lymphocytes  
Mutat. Res. 104 (1982) 267 - 273
- ABE, S. und M. SASAKI: Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese hamster cells exposed to various chemicals  
J. Nat. Cancer Inst. 58 (1977) 1635 - 1641
- ABE, S. und M. SASAKI: Induction of sister-chromatid exchanges by indirect mutagens/carcinogens in cultured rat hepatoma and esophageal tumor cells and in chinese hamster DON cells cocultivated with rat cells  
Mutat. Res. 93 (1982,a) 409 - 418
- ABE, S. und M. SASAKI: SCE as an index of mutagenesis and /or carcinogenesis. In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol.2 , Sister chromatid exchange.  
Alan R. Liss Inc., N.Y. (1982,b) 461 - 514
- ABE, T., T. IDE, M. TOSA, T. TAKAHASHI, T. TAKINO: Activation of cyclophosphamide using perfused rat liver system and induction of sister chromatid exchanges in vitro  
Hum. Genet. 58 (1981) 349
- ABRAHAMSON, S.: Estimating radiation-induced genetic disease burdens. In: V.K. Mc Elheny, S. Abrahamson (Hrsg.) Banbury Report 1. Assessing chemical mutagens: The risk to humans  
Cold Spring Harbor Laboratory (1979) 147 - 156
- ALBERMAN, E., M. CREASY, M. ELLIOT, C. SPICER: Maternal factors associated with fetal chromosomal anomalies in spontaneous abortions  
Brit. J. Obstet. Gynaec. 83 (1976) 621 - 627
- ALLI, F.N. und J.M. PARRY: Studies on the induction of genetic damage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Abstract of the UKEMS Annual Meeting, 1982)  
Environ. Mutagen. 5 (1983) 248
- AMES, B.N.: Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer  
Science 204 (1979) 587 - 593

- AMES, B.N., W.E. DURSTON, E. YAMASAKI, F.D. LEE: Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 (1973) 2281 - 2285
- ANDERSON, D. und J.A. STYLES: An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. Appendix 2. The bacterial mutation test  
Brit. J. Cancer 37 (1978) 924 - 930
- ANDERSSON, L.C., V-P. LEHTO, S. STENMAN, R.A. BRADLEY, I. VIRTANEN: Diazepam induces mitotic arrest at pro-metaphase by inhibiting centriolar separation  
Nature 291 (1981) 247 - 248
- ANSARI, S.R. und U.M. ADHAMI: Effect of antifertility drugs (norethindrone and mestranole) on the bone marrow chromosomes of albino rat (*Rattus norvegicus*)  
Indian J. Hered. 9 (1977) 7 - 9
- ARRIGHI, F.E. und T.C. HSU: Localization of heterochromatin in human chromosomes  
Cytogenetics 10 (1971) 81 - 86
- AU, W.W., D.A. JOHNSTON, C. COLLIE-BRUYERE, T.C. HSU: Short term cytogenetic assays of nine cancer chemotherapeutic drugs with metabolic activation  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 455 - 464
- AUERBACH, C.: Mutation Research. Problems, results and perspectives  
Chapman and Hall, London (1976)
- AWA, A.A.: Cytogenetic and oncogenic effects of the ionizing radiation of the atomic bombs. In: J. German (Hrsg.) Chromosomes and cancer  
J. Wiley and Sons, New York (1974) 637 - 674
- BADR, A.: Cytogenetic activities of a triazine herbicide in root tips of *Allium cepa* and *Vicia faba*  
Mutat. Res. 117 (1983) 173 - 182
- BADR, F.M. und R.S. BADR: Studies on the mutagenic effect of contraceptive drugs I. Induction of dominant lethal mutations in female mice  
Mutat. Res. 26 (1974) 529 - 534
- BAJER, A.S. und J. MOLE-BAJER: Spindle dynamics and chromosome movements  
Academic Press, New York, London (1972)

- BARRETT, J.C., A. WONG, J.A. MC LACHLAN: Diethylstilbestrol induces neoplastic transformation without measurable gene mutation at two loci  
Science, 212 (1981) 1402 - 1404
- BARRETT, J.C., J.A. MC LACHLAN, E. ELMORE: Inability of Diethylstilbestrol to induce 6-thioguanine resistant mutants and to inhibit metabolic cooperation of V 79 chinese hamster cells  
Mutat. Res. 107 (1983) 427 - 432
- BARTSCH, H. und L. TOMATIS: Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC-Monographs  
Environ. Health Perspect. 47 (1983) 305 - 317
- BARTSCH, H., C. MALAVEILLE, A.M. CAMUS, G. MARTEL-PLANCHE, G. BRUN, A. HAUTEFEUILLE, N. SABADIE, A. BARBIN, T. KUROKI, C. DREVON, C. PICCOLI, R. MONTESANO: Validation and comparative studies on 180 chemicals with Salmonella typhimurium strains and V 79 Chinese hamster  
Mutat. Res. 76 (1980) 1 - 50
- BASLER, A., M. BAUMANN, G. RÖHRBORN: In vitro testing of chlorpropamide with human lymphocyte cultures in the presence of liver microsome fraction S9 mix of rats  
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 32 (1982) 724 - 726
- BATEMAN, A.J. und S.S. EPSTEIN: Dominant lethal mutations in mammals. In: A. Hollaender (Hrsg.) Chemical mutagens Principles and methods for their detection Vol.2  
Plenum Press, New York (1971) 541 - 568
- BAUER, K.H.: Mutationstheorie und Geschwulstentstehung. Übergang von Körperzellen zu Geschwulstzellen durch Genänderung  
Springer, Berlin (1928)
- BEATTY, R.A.: Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development  
Cambridge University Press (1957)
- BECKER, K. und J. SCHÖNEICH: Effects of oestrogen on meiosis in female mice ( Abstract 10<sup>th</sup> annual meeting EEMS)  
Mutat. Res. 85 (1981) 226
- BEEK, B., G. OBE: The human leukocyte test system VI. The use of sister chromatid exchanges as possible indicators for mutagenic activities  
Humangenetik 29 (1975) 127 - 134

- BIANCHI, N.O., M.S. BIANCHI, M. LARRAMENDY: Kinetics of human lymphocyte division and chromosomal radiosensitivity  
Mutat. Res. 63 (1979) 317 - 324
- BIGNAMI, M., F. AULICINO, A. VELLICH, A. CARRERE, G. MORGURO: Mutagenic and recombinogenic action of pesticides in *Aspergillus nidulans*  
Mutat. Res. 46 (1977) 395 - 402
- BIMBOES, D. und H. GREIM: Human lymphocytes as target cells in a metabolizing test system in vitro for detecting potential mutagens  
Mutat. Res. 35 (1976) 155 - 160
- BISHOP J.M.: Oncogenes  
Scientific American 246 (1982) 69 - 78
- BISHUN, N.P.: Chromosomes and oral contraceptives  
Proc. Roy. Soc. Med. 69 (1976) 353 - 356
- BISHUN, N.P., J. MILLS, D.V. PARKE, D.C. WILLIAMS: A cytogenetic study in women who had used oral contraceptives and in their progeny  
Mutat. Res. 33 (1975) 299 - 310
- BISHUN, N.P., N. SMITH, D.C. WILLIAMS, J. MILLS: Cytological effects of the oral contraceptive  
Mutat. Res. 39 (1976,a) 97 - 110
- BISHUN, N.P., D.C. WILLIAMS, R.W. RAVEN, J. MILLS: Lymphocyte transformation in newborns, normal women and those who had used oral contraceptives  
Cytobios. 16 (1976,b) 193 - 202
- BISHUN, N.P., N. SMITH, H. EDDIE, D.C. WILLIAMS: Cytogenetics studies and diethylstilboestrol (Abstract, 6<sup>th</sup> annual meeting EEMS)  
Mutat. Res. 46 (1977,a) 211 - 212
- BISHUN, N.P., N. SMITH, D.C. WILLIAMS, R.W. RAVEN: Carcinogenic and possible mutagenic effects of stilbestrol in offspring exposed in utero  
J. Surg. Oncol. 9 (1977,b) 293 - 300
- BLACKBURN, G.M., A.J. FLAVELL, M.H. THOMPSON: Oxidative and photochemical linkage of diethylstilbestrol to DNA in vitro  
Cancer Res. 34 (1974) 2015 - 2019

- BLEWITT, R.W., A.C. ABBOTT, C.C. BIRD: Mode of cell death induced in human lymphoid cells by high and low doses of glucocorticoid  
Brit. J. Cancer 47 (1983) 477 - 486
- BOUE, A. und J. BOUE: Chromosomal and anatomic studies of conceptions following the discontinuation of steroid contraceptives  
J. Gynec. Obstet. Biol. Reprod. 2 (1973,a) 141 - 154
- BOUE, A. und J. BOUE: Actions of steroid contraceptives on gametic material  
Geburtshilfe Frauenheilkunde 33 (1973,b) 77 - 85
- BOUE, J., A. BOUE, P. LAZAR: Epidemiology of human spontaneous abortions with chromosomal abnormalities  
Aging Gametes, Biol. Path., Proc. Int. Symp. (1975,a) 330 - 348
- BOUE, J., A. BOUE, P. LAZAR: Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions  
Teratology 12 (1975,b) 11 - 26
- BOVERI, T.: Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren  
Fischer, Jena (1914)
- BOYLE, W.S.: Cytogenetic effects of benlate fungicide on *Allium cepa* and *Secale cereale*  
J. Hered. 64 (1973) 49 - 50
- BRENNER, S., D. PEPPER, M.W. BERNIS, E. TAN, B.R. BRINKLEY: Kinetochore structure, duplication, and distribution in mammalian cells: analysis by human autoantibodies from Scleroderma patients.  
J. Cell Biol. 91 (1981) 95 - 102
- BRIGGS, M.H. und M. BRIGGS: Oral contraceptives, Vol. 5  
Eden Press Annual Research News, Westmount (Canada), St.Albans (USA), (1981)
- BYNUM, G., D. KRAM, R. DEAN, E. HADLEY, R. MONTICONE, C. BICKINGS, E. SCHNEIDER: Steroid modulation of sister chromatid exchange induction by Mitomycin C and UV-light (Abstract 11<sup>th</sup> annual meeting EMS)  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 247
- BYNUM, G., H. SLOR, M. MATTERN, R. DEAN, D. KRAM: Hormonal modification of DNA supercoiling modulates access to DNA-damage sites (Abstract 12<sup>th</sup> annual meeting EMS)  
Environ. Mutagen. 3 (1981) 343 - 344

- CAIRNS, J.: Cancer: Science and society  
Freeman, San Francisco (1978)
- CAMACHO, A.M., D.L. WILLIAMS, J.M. MONTALVO: Alterations of testicular histology and chromosomes in patients with constitutional sexual precocity treated with medroxyprogesterone acetate  
J. Clin. Endocrinol. Metab. 34 (1972) 279 - 286
- CARR, D.H.: Chromosomes after oral contraceptives  
Lancet (1967) II, 830 - 831
- CARR, D.H.: Chromosome studies in selected spontaneous abortions. 1. Conception after oral contraceptives  
Canad. Medic. Assoc. J. 103 (1970) 343 - 348
- CARRANO, A.V., L.H. THOMPSON, P.A. LINDL, J.L. MINKLER: Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis  
Nature 271 (1978) 551 - 553
- CARRANO, A.V., J.L. MINKLER, D.G. STETKA, D.H. MOORE II: Variation in the baseline sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 325 - 337
- CHANG, C.C., J.E. TROSKO, S.T. WARREN: In vitro assay for human tumor promoters and anti-promoters  
J. Environm. Pathol. Toxicol. 2 (1978) 43 - 64
- CHENG, M., M.K. CONNER, Y. ALARIE: Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities  
Cancer Res. 41 (1981) 4489 - 4492
- CHRISMAN, C.L.: Aneuploidy in mouse embryos induced by diethylstilbestrol diphosphate  
Teratology 9 (1974) 229 - 232
- CHRISMAN, C.L. und L.L. HINKLE: Induction of aneuploidy in mouse bone marrow cells with diethylstilbestrol-diphosphate  
Can. J. Genet. Cytol. 16 (1974) 831 - 835
- CHRISMAN, C.L. und A.P. BAUMGARTNER: Cytogenetic effects of diethylstilbestrol diphosphate (DES-dp) on mouse bone marrow monitored by the micronucleus test  
Mutat. Res. 67 (1979) 157 - 160

- CLAYSON, D.B.: Carcinogens and carcinogenesis enhancers  
Mutat. Res. 86 (1981) 217 - 229
- CLEAVER, J.E.: Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes - a model for the mechanism of SCE production  
Experim. Cell Res. 136 (1981) 27 - 30
- CLEAVER, J.E. und R.B. PAINTER: Absence of specificity in inhibition of DNA repair replication by DNA-binding agents, cocarcinogens and steroids in human cells  
Cancer Res. 35 (1975) 1773 - 1778
- CLIVE, D., R. MC CUEN, J.F.S. SPECTOR, C. PIPER, K.H. MA-  
VOURNIN: Specific gene mutations in L 5178 Y cells in culture. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program  
Mutat. Res. 115 (1983) 225 - 251
- CONNOR, T.H., G. CANTELLI FORTI, P. SITRA, M.S. LEGATOR: Bile as a source of mutagenic metabolites produced in vivo and detected by *S. typhimurium*  
Environ. Mutagen. 1 (1979) 269 - 276
- CORTINAS DE NAVA, C., J. ESPINOSA, L. GARCIA, A.M. ZAPATA, E. MARTINEZ: Mutagenicity of antiamebic and anthelmintic drugs in the *Salmonella typhimurium* microsomal test system  
Mutat. Res. 117 (1983) 79 - 91
- CROSSEN, P.E.: SCE in lymphocytes. In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol.2, Sister chromatid exchange.  
Alan R. Liss Inc., N.Y. (1982) 175 - 193
- DANFORD, N. und J.M. PARRY: Abnormal cell division in cultured human fibroblasts after exposure to diethylstilbestrol  
Mutat. Res. 103 (1982) 379 - 382
- DANFORD, N., E.M. PARRY, G. MALALLAH, J.M. PARRY: The induction of aneuploidy in cultured mammalian cells by diethylstilbestrol (Abstract 11<sup>th</sup> annual meeting EEMS)  
Mutat. Res. 97 (1982) 462 - 463
- DASSENNOY, B. und J.A. MEYER: Mutagenic effect of Benomyl on *Fusarium oxysporum*  
Mutat. Res. 21 (1973) 119 - 120

- DAVIDSE, L.C.: Antimitotic activity of Methylbenzimidazol-2-yl carbamate in *Aspergillus nidulans*  
Pestic. Biochem. Physiol. 3 (1973) 317 - 325
- DAVIDSE, L.C.: Antimitotic activity of Methylbenzimidazol-2-yl carbamate in fungi and its binding to cellular proteins. In: M. Borgers und M. De Brabander (Hrsg.) Microtubules and microtubule inhibitors  
North Holland, Amsterdam (1975) 483 - 495
- DAYAN, J., M.C. CRAJER, S. BERTOZZI, S. LEFRANCOIS: Application of the *Salmonella typhimurium* microsome test to the study of 25 drugs belonging to 5 chemical series  
Mutat. Res. 77 (1980) 301 - 306
- DEAN, R., G. BYNUM, D. KRAM, E.L. SCHNEIDER: Sister chromatid exchange induction by carcinogens in HTC-cells. An in vitro system which does not require addition of activating factors  
Mutat. Res. 74 (1980) 477 - 483
- DE BERTOLDI, M., M. GRISELLI, M. GIOVANNETTI, R. BARALE: Mutagenicity of pesticides evaluated by means of gene-conversion in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Aspergillus nidulans*  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 359 - 370
- DE BRABANDER, M., R. VAN DE VEIRE, F. AERTS, S. GEUENS, J. HOEBEKE: A new culture model facilitating rapid quantitative testing of mitotic spindle inhibition in mammalian cells  
J. Nat. Cancer Inst. 56 (1976,a) 357 - 363
- DE BRABANDER, M., R. VAN DE VEIRE, F. AERTS, M. BORGERS, P. JANSSEN: The effects of methyl 5-(2-thienylcarbonyl)-1H-benzimidazole-2-yl-carbamate (R 17934, NSC 238159), a new synthetic antitumoral drug interfering with microtubules, on mammalian cells cultured in vitro  
Cancer Res. 36 (1976,b) 905 - 916
- DE SERRES, F.J. und J. ASHBY: Evaluation of short-term tests for carcinogenesis. Report of the International Collaborative Program  
Elsevier/North Holland, New York, Amsterdam, Oxford (1981)

- DOLL, R. und R. PETO: The causes of cancer: Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today  
J. Nat. Cancer Inst. 66 (1981) 1191 - 1308
- DOMANY, Z., G. SEREGELY, E. CZEIZEL: Chromosome examinations following treatment with contraceptive pills produced in Hungary  
Ther. Hung. 23 (1975) 50 - 53
- DREVON, C., C. PICCOLI, R. MONTESANO: Mutagenicity assays of estrogenic hormones in mammalian cells  
Mutat. Res. 89 (1981) 83 - 90
- DRUCKREY, H., P. DANNEBERG, D. SCHMÄHL: Mitosegiftwirkung von Oestrogenen  
Naturwissenschaften 39 (1952) 381 - 382
- DUDIN, G., B. BEEK, G. OBE: The human leukocyte test system. I. DNA synthesis and mitosis in PHA-stimulated 2-day cultures  
Mutat. Res. 23 (1974) 279 - 281
- DUNKEL, V.C., R.J. PIENTA, A. SIVAK, K. TRAU: Comparative neoplastic transformation responses of BALB/3T3 cells, syrian hamster embryo cells, and Rauscher murine leukemia virus-infected Fischer 344 rat embryo cells to chemical carcinogens  
J. Nat. Cancer Inst. 67 (1981) 1303 - 1315
- DUNNETT, C.W.: A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control  
J. Americ. Statistical Assoc. 50 (1955) 1096 - 1121
- DUNNETT, C.W.: New tables for multiple comparisons with a control  
Biometrics, 20 (1964) 482 - 491
- EHRENBERG, U.: Risk assessment of ethylene oxide and other compounds. In V.K. Mc Elheny, S. Abrahamson (Hrsg.), Banbury Report 1. Assessing chemical mutagens: The risk to humans  
Cold Spring Harbor Laboratory (1979) 157 - 190
- EIGSTI, O.J. und P. DUSTIN jr.: Colchicine - in agriculture, medicine, biology and chemistry  
The Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA (1955)

- EMERIT, I. und P.A. CERUTTI: Tumor promotor phorbol 12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage via indirect action  
Nature 293 (1981) 144 - 146
- EPSTEIN, S.S., E. ARNOLD, J. ANDREA, W. BASS, Y. BISHOP: Detection of chemical mutagens by the dominant lethal assay in the mouse  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 23 (1972) 288 - 325
- EVANS, E.L. und A.D. MITCHELL: Effects of 20 coded chemicals on sister chromatid exchange frequencies in cultured chinese hamster cells. In: F.J. De Serres und J. Ashby (Hrsg.), Progress in mutation research Vol. 1 Evaluation of short-term tests for carcinogenesis. Elsevier/North Holland, N.Y., Amsterdam, Oxford (1981) 538 - 550
- EVANS, H.J. und D.C. LLOYD: Mutagen induced chromosome damage in man  
Edinburgh University Press, Edinburgh (1978)
- EVANS, H.J., K.E. BUCKTON, G.E. HAMILTON, A. CAROTHERS: Radiation-induced chromosomal aberrations in nuclear dockyard workers  
Nature 277 (1979) 531 - 534
- FAHRIG, R.: Effects of food additives in the mammalian spot test. In: Mutagens in our environment  
Alan R. Liss Inc. N.Y. (1982) 339 - 348
- FAHRIG, R. und J.P. SEILER: Dose and effect of methyl-2-benzimidazolyl carbamate in the "mammalian spot test", an in vivo method for the detection of genetic alterations in somatic cells of mice  
Chem.-Biol. Interactions 26 (1979) 115 - 120
- FAIT, J., K. ZAK, R. ADAMEK: Chromosomal examination following application of Depo Provera  
Zbl. Gynäk. 94 (1972) 1194 - 1197
- FILATCHEVA, L.F.: On some mechanisms of inducing pathological mitoses by estradiol  
Tsitollogiya 11 (1969) 1576 - 1580
- FISHBEIN, L., W.G. FLAMM, H.L. FALK: Chemical mutagens. Environmental effects on biological systems  
Academic Press, N.Y., London (1970)

- FITZGERALD, P.H., A.F. PICKERING, D.N. FERGUSON, J.W. HAMER:  
Long-term use of oral contraceptives: a study of  
chromosomes and lymphocyte transformation  
Aust. N.Z. J. Med. 3 (1973) 572 - 575
- FLEISS, J.L.: Statistical methods for rates and properties  
J. Wiley and Sons, N.Y. (1979)
- FLOCKS, R.H., H. MARBERGER, B.J. BEGLEY, L.J. PENDERGAST:  
Prostatic carcinoma: treatment of advanced cases  
with diethylstilbestrol diphosphate  
J. Urol. 74 (1955) 549 - 551
- FU, Y.S., J.W. REAGAN, R.M. RICHART, D.E. TOWNSEND: Nuclear  
DNA and histologic studies of genital lesions in di-  
ethylstilbestrol-exposed progeny. I. Intraepithelial  
squamous abnormalities  
Americ. Journ. Clin. Pathol. 72 (1979,a) 503 - 514
- FU, Y.S., J.W. REAGAN, R.M. RICHART, D.E. TOWNSEND: Nuclear  
DNA and histologic studies of genital lesions in di-  
ethylstilbestrol-exposed progeny. II. Intraepithe-  
lial glandular abnormalities  
Americ. Journ. Clin. Pathol. 72 (1979,b) 515 - 520
- GAAL, M., J. LASZLO, P. BÖSZE: Cytogenetic investigation of  
six patients with X isochromosomes, i (Xq) and of  
two subjects with isodicentric X chromosomes, idic  
(Xq)  
Hum. Genet. 58 (1981) 362 - 365
- GALLOWAY, S.M. und S. WOLFF: The relation between chemically  
induced sister chromatid exchanges and chromatid  
breakage  
Mutat. Res. 61 (1979) 297 - 307
- GAUDIN, D., R.G. GREGG, K.L. YIELDING: DNA-repair inhibi-  
tion: a possible mechanism of action of co-carcino-  
gens  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 (1971) 630 - 636
- GAUDIN, D., L. GUTHRIE, K.L. YIELDING: DNA-repair inhibi-  
tion: a new mechanism of action of steroids with  
possible implications for tumor therapy  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146 (1974) 401 - 405
- GEBHART, E.: Chemische Mutagenese  
G. Fischer Verlag, Stuttgart, N.Y. (1977)

- GEBHART, E.: Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing  
Hum. Genet. 58 (1981) 235 - 254
- GENTIL, A.: Effects of tumor promoters on sister chromatid exchange. In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol.2 Sister Chromatid Exchange  
A.R. Liss Inc. N.Y. (1982) 535 - 549
- GLATT, H.R., M. METZLER, F. OESCH: Diethylstilbestrol and 11 derivatives. A mutagenicity study with *Salmonella typhimurium*  
Mutat. Res. 67 (1979) 113 - 121
- GLATT, H.R., F. OESCH, H.-G. NEUMANN: Factors responsible for the metabolic formation and inactivation of bacterial mutagens from trans-4-acetylaminostilbene  
Mutat. Res. 73 (1980) 237 - 250
- GLATT, H., R. JUNG, F. OESCH: Bacterial mutagenicity investigation of epoxides: drugs, drug metabolites, steroids and pesticides  
Mutat. Res. 111 (1983) 99 - 118
- GOH, K.O.: Chromosomal breaks in women taking birth control pills  
USAEC-ORAU 106 (1967) Res. Report 97 - 104
- GOSWAMI, H.K.: Effect of oral contraceptives on plant chromosomes  
Curr. Sci. 47 (1978) 515 - 516
- GRIFFITHS, A.J.F.: Neurospora prototroph selection system for studying aneuploid production  
Environ. Health Persp. 31 (1979) 75 - 80
- GUALANDI, G. und D. BELLINCAMPI: Induced gene mutation and mitotic non-disjunction in *A. nidulans*  
Toxicol. Letters 9 (1981) 389 - 394
- GUTIERREZ, A.C. DE und R. LISKER: Longitudinal study of the effects of oral contraceptives on human chromosomes  
Ann. Genet. 16 (1973) 259 - 262
- GUTIERREZ, C. und A. CALVO: Approximation of baseline and BrdU-induced SCE frequencies  
Chromosoma 83 (1981) 685 - 695

- GUTIERREZ, C. und J.F. LOPEZ-SAEZ: Oxygen dependence of sister-chromatid exchanges  
Mutat. Res. 103 (1982) 295 - 302
- GUTIERREZ, C., J.B. SCHVARTZMAN, J.F. LOPEZ-SAEZ: Effect of growth temperature on the formation of sister-chromatid exchanges in Brd Urd-substituted chromosomes  
Exp. Cell Res. 134 (1981) 73 - 79
- HAKHEEM, H. und S. AMER: Meiotic effects of water extracts of some contraceptive tablets  
Naturwissenschaften 53 (1966) 184
- HARRIS, C.C.: Carcinogenesis studies using cultured human tissues and cells  
Cancer Res. 43 (1983) 1880 - 1883
- HART, R.W., S. HAYS, D. BRASH, F.B. DANIEL, M.T. DAVIS, N.J. LEWIS: In vitro assessment and mechanism of action of environmental pollutants  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 298 (1977) 141 - 158
- HASELBACHER, G.K. und A.J. EISENFELD: Macromolecular binding of estradiol by nuclei in a cell-free system  
Biochem. Pharmacol. 25 (1976) 2571 - 2581
- HASTIE, A.C.: Benlate-induced instability of Aspergillus diploids  
Nature 226 (1970) 771
- HEDDLE, J.A.: On the use of multiple assays for mutagenicity, especially the micronucleus, Salmonella, and sperm abnormality assays. In: D.Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Hrsg.) Progress in Genetic Toxicology Elsevier/North Holland (1977) 265 - 274
- HEDDLE, J.A. und W.R. BRUCE: Comparison of tests for mutagenicity or carcinogenicity using assays for sperm abnormalities, formation of micronuclei, and mutations in Salmonella. In: H.H. Hiatt, J.D. Watson, J.A. Winsten (Hrsg.) Origins of Human Cancer, Book C, Human Risk Assessment  
Cold Spring Harbor Laboratory (1977) 1549 - 1557
- HEDDLE, J.A., R.D. BENZ, P.I. COUNTRYMAN: Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. In: H.J. Evans, D.C. Lloyd (Hrsg.) Mutagen-induced chromosome damage in man  
Edinburgh University Press, (1978) 191 - 200

- HEMMERLY, J. und M. DEMEREC: Tests of chemicals for mutagenicity  
Cancer Res. 15 (Suppl. 3) (1955) 69 - 75
- HENKE, H., G. HOEHNE, H.A. KUENKEL: Studies on the mutagenic effect of some cytostatics  
Z. Krebsforsch. 62 (1958) 347 - 355
- HENRICH, R.T., T. NOGAWA, A. MORISHIMA: In vitro induction of segregational errors of chromosomes by natural cannabinoids in normal human lymphocytes  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 139 - 147
- HERBST, A.L., H. ULFELDER, D.C. POSKANZER: Adeno carcinoma of the vagina, association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women  
N. Engl. J. Med. 284 (1971) 878 - 881
- HIATT, H.H., J.D. WATSON, J.A. WINSTEN: Origins of human cancer. A. Incidence of cancer in humans. B. Mechanisms of carcinogenesis. C. Human risk assessment  
Cold Spring Harbor Laboratory (1977)
- HILF, R. und J.L. WITTLIFF: Characterization of human breast cancer by examination of cytoplasmic enzyme activities and estrogen receptors. In: K.W. Mc Kerns (Hrsg.) Hormones and Cancer  
Academic Press, New York, London (1974) 103 - 130
- HILL, A. und S. WOLFF: Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women  
Cancer Res. 42 (1982) 893 - 896
- HILL, A. und S. WOLFF: Sister chromatid exchanges and cell division delays induced by diethylstilbestrol, estradiol, and estriol in human lymphocytes  
Cancer Res. 43 (1983) 4114 - 4118
- HOFFMAN, G.R.: Workshop on systems for the detection of mutagen-induced aneuploidy  
Environ. Mutagen. 3 (1981) 197 - 199
- HOFFMAN, R.M., S.J. JACOBSEN, R.W. ERBE: Reversion to methionine independence in simian virus 40-transformed human and malignant rat fibroblasts is associated with altered ploidy and altered properties of transformation  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 1313 - 1317

- HOLDEN, H.C., P.A. CRIDER, M.G. WAHRENBURG: Mitotic arrest by benzimidazole analogs in human lymphocyte cultures  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 67 - 73
- HOLLAENDER, A. und F.J. DE SERRES (Hrsg.): Chemical mutagens Principles and methods for their detection (Vol.5)  
Plenum Press, N.Y., London (1978)
- HOLLSTEIN, M., J. MC CANN, F.A. ANGELOSANTO, W.W. NICHOLS: Short term tests for carcinogens and mutagens  
Mutat. Res. 65 (1979) 133 - 226
- HOOK, E.B.: Perspectives in mutation epidemiology 3. Contribution of chromosome abnormalities to human morbidity and mortality and some comments upon surveillance of chromosome mutation rates  
Mutat. Res. 114 (1983) 389 - 423
- HOOK, E.B. und I.H. PORTER: Population cytogenetics, studies in humans  
Academic Press, N.Y., San Francisco, London (1977)
- HOPKIN, J.M. und H.J. EVANS: Cigarette smoke condensates damage DNA in human lymphocytes  
Nature 279 (1979) 241 - 242
- HSUEH, J.L., H.H. CHEN, C.C. HUANG: Effect of tumor promotor 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate on the induction of sister chromatid exchanges in chinese hamster V 79 cells treated with mutagens  
Mutat. Res. 81 (1981) 387 - 394
- HUSMANN, F.: Hormonale Kontrazeption  
Goldmann Verlag, München (1970)
- HUSUM, B., H.C. WULF, E. NIEBUHR: Sister-chromatid exchanges in lymphocytes in women with cancer of the breast  
Mutat. Res. 85 (1981) 357 - 362
- HUSUM, B., H.C. WULF, E. NIEBUHR: Normal sister-chromatid exchanges in oral contraceptive users  
Mutat. Res. 103 (1982) 161 - 164
- IARC-MONOGRAPHIEN (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER): Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans  
(IARC-Monographs), Vol. 1 (1971) bis Vol. 29 (1982)

- INGEROWSKI, G.H., M. SCHEUTWINKEL-REICH, H.J. STAN: Mutagenicity studies on veterinary anabolic drugs with the Salmonella/Microsome test  
Mutat. Res. 91 (1981) 93 - 98
- IKUSHIMA, T. und S. WOLFF: Sister chromatid exchanges induced by light flashes to 5-bromodeoxyuridine and 5-iododeoxyuridine substituted chinese hamster chromosomes  
Exp. Cell Res. 87 (1974) 15 - 19
- ISHIDATE jr., M. und S. ODASHIMA: Chromosome tests with 134 compounds on chinese hamster cells in vitro - a screening for chemical carcinogens  
Mutat. Res. 48 (1977) 337 - 354
- IVETT, J.L. und R.R. TICE: Diethylstilbestrol-diphosphate induces chromosomal aberrations but not sister chromatid exchanges in murine bone marrow cells in vivo  
Environ. Mutagen. 3 (1981) 445 - 452
- JAGGI, W., W.K. LUTZ, C. SCHLATTER: Covalent binding of ethinylestradiol and estrone to rat liver DNA in vivo  
Chem. Biol. Interactions 23 (1978) 13 - 18
- JAGIELLO, G. und J.S. LIN: Oral contraceptive compounds and mammalian oocyte meiosis  
Amer. J. Obstet. Gynec. 120 (1974) 390 - 406
- JAMES, D.A. und D.M. SMITH: Analysis of results from a collaborative study of the dominant lethal assay  
Mutat. Res. 97 (1982) 303 - 314
- JENSSEN, D. und C. RAMEL: The micronucleus test as a part of a short-term mutagenicity test program for the prediction of carcinogenicity evaluated by 143 agents tested  
Mutat. Res. 75 (1980) 191 - 202
- JUDES, U.: Chemische Karzinogenese, Wirkungen kleiner Dosen  
Naturwissensch. Rundschau 32 (1979) 456 - 457
- KÄFER, E., B.R. SCOTT, G.L. DORN, R. STAFFORD: Aspergillus nidulans: systems and results of tests for chemical induction of mitotic segregation and mutation. I. Diploid and duplication assay systems  
Mutat. Res. 98 (1982) 1 - 48

- KAISER, R.: Das Tumorrisiko bei der Anwendung von kontrazeptiven Steroiden. In: H. Kewitz (Hrsg.) Nebenwirkungen kontrazeptiver Steroide Westkreuz Verlag, Berlin (1971) 156 - 170
- KAJII, T. und K. OHAMA: Sporadic triploid and hexaploid cells in embryonic tissue: negative relationship to maternal intake of oral contraceptives Ann. Genet. 15 (1972) 11 - 18
- KAJII, T. und N. NIIKAWA: Origin of triploidy and tetraploidy in man. 11 cases with chromosome markers Cytogenet. Cell Genet. 18 (1977) 109 - 125
- KALTER, H.: Some relations between teratogenesis and mutagenesis Mutat. Res. 33 (1975) 29 - 36
- KANG, Y.S., H.S. KANG, S.D. PARK: Studies on the effects of steroids on DNA synthesis of human chromosomes in vitro Canad. J. Genet. Cytol. 10 (1968) 299 - 310
- KAPP jr., R.W. und C.B. JACOBSON: Analysis of human spermatozoa for Y chromosomal nondisjunction Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 1 (1980) 193 - 211
- KAPPAS, A.: On the mechanisms of induced somatic recombination by certain fungicides in *Aspergillus nidulans* Mutat. Res. 51 (1978) 189 - 197
- KAPPAS, A.: The genotoxicity of benomyl (Abstract 10<sup>th</sup> annual meeting EEMS) Mutat. Res. 85 (1981,a) 219
- KAPPAS, A.: The genotoxicity of benomyl. In A.Kappas (Hrsg.) Progress in Mutation Research Vol. 2 Elsevier/North Holland, Amsterdam (1981,b)
- KAPPAS, A. und B.A. BRIDGES: Induction of point mutations by Benomyl in DNA-repair deficient *Aspergillus nidulans* Mutat. Res. 91 (1981) 115 - 118
- KAPPAS, A., S.G. GEORGOPOULOS, A.C. HASTIE: On the genetic activity of benzimidazole and thiophanate fungicides on diploid *Aspergillus nidulans* Mutat. Res. 26 (1974) 17 - 27
- KAPPAS, A., M.H.L. GREEN, B.A. BRIDGES, A.M. ROGERS, W.J. MURIEL: Benomyl, a novel type of base analogue mutagen? Mutat. Res. 40 (1976) 379 - 382

- KATO, H.: Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method  
Nature 251 (1974) 70 - 72
- KAWACHI, T., I. YAHAGI, T. KADA, Y. TAZIMA, M. ISHIDATE, M. SASAKI, T. SUGIYAMA: Cooperative program on short-term assays for carcinogenicity in Japan  
Int. Agency Res. Cancer Sci. Publ. 27 (1980)  
323 - 330
- KENNEDY, B.J. und I.T. NATHANSON: Effects of intensive sex steroid hormone therapy in advanced breast cancer  
J. Amer. Med. Ass. 152 (1953) 1135 - 1141
- KILBEY, B.J., M. LEGATOR, W. NICHOLS, C. RAMEL: Handbook of mutagenicity test procedures  
Elsevier, Amsterdam, N.Y., Oxford (1977)
- KINSELLA, A.R. und M. RADMANN: Tumor promotor induces sister chromatid exchanges: relevance to mechanisms of carcinogenesis  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 (1978) 6149 - 6153
- KINSELLA, A.R. und M. RADMAN: The role of promoters in two-step carcinogenesis: a hypothesis. In: M. Alacevic (Hrsg.) Progress in environmental mutagenesis  
Elsevier, North Holland Biomedical Press (1980)  
261 - 273
- KIRKHART, B.: Micronucleus test on 21 compounds. In: F.J. De Serres und J. Ashby (Hrsg.) Progress in mutation research Vol. 1 Evaluation of short-term tests for carcinogenesis.  
Elsevier/North Holland, N.Y., Amsterdam, Oxford (1981) 698 - 704
- KIRSCH-VOLDERS, M., A. ALEXANDER, T. TIBOLDI: Effects of Depo-medroxyprogesterone acetate (DMPA) on the karyotypes  
Cah. Med. Travail 13 (1976) 97 - 102
- KLEIN, G.: The role of gene dosage and genetic transpositions in carcinogenesis  
Nature 294 (1981) 313 - 318
- KLINGER, H.P. und M. GLASSER: Correlation of maternal contraceptive history with chromosomes, sex ratio and anthropometric measurements of the fetus and neonate. In: E.B. Hook, I.H. Porter (Hrsg.) Population cytogenetics  
Academic Press, N.Y. (1977) 27 - 43

- KLINGER, H.P., M. GLASSER, H.W. KAVA: Contraceptives and the conceptus. I. Chromosome abnormalities of the fetus and neonate related to maternal contraceptive history  
Obstet. and Gynec. 48 (1976) 40 - 48
- KRÄMMER, G.: Entsteht Krebs durch die Aktivierung zelleigener Gene?  
Biologie in unserer Zeit 12 (1982) 145 - 153
- KRISHAN, A.: Cytochalasin-B: Time-lapse cinematographic studies on its effect on cytokinesis  
J. Cell Biol. 54 (1972) 657
- KUBINSKI, H., G.E. GUTZKE, Z.O. KUBINSKI: DNA-cell binding (DCB) assay for suspected carcinogens and mutagens  
Mutat. Res. 89 (1981) 95 - 136
- KUCHLER, R.J. und R.C. GRAUER: Effect of natural estrogens on L-strain fibroblasts in tissue cultures  
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 110 (1962) 287 - 292
- KUCHLER, R.J., N.J. ARNOLD, R.C. GRAUER: Estradiol-cellular interaction in tissue culture  
Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.) 111 (1962) 798 - 804
- KYRTOPOULOS, S. und K. ATHANASSIOU: Induction of sister-chromatid exchanges by carcinogens not known to damage DNA (Abstract 10<sup>th</sup> annual meeting EEMS)  
Mutat. Res. 85 (1981) 276
- LANG, R. und U. REDMANN: Non-mutagenicity of some sex hormones in the Ames Salmonella/Microsome mutagenicity test  
Mutat. Res. 67 (1979) 361 - 365
- LANKAS, G.R., C.S. BAXTER, R.T. CHRISTIAN: Effect of tumor promoting agents on mutation frequencies in cultured V79 chinese hamster cells  
Mutat. Res. 45 (1977) 153 - 156
- LATT, S.A.: Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70 (1973) 3395 - 3399
- LATT, S.A.: Sister chromatid exchange formation  
Ann. Rev. Genet. 15 (1981) 11 - 55

- LATT, S.A., J. ALLEN, S.E. BLOOM, A. CARRANO, E. FALKE, D. KRAM, E. SCHNEIDER, R. SCHRECK, R. TICE, B. WHITFIELD, S. WOLFF: Sister-chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox Program  
Mutat. Res. 87 (1981) 17 - 62
- LAURITSEN, J.G.: Significance of oral contraceptives in causing chromosome anomalies in spontaneous abortions  
Acta Obstet. Gynec. Scand. 54 (1975) 261 - 264
- LEONARD, A., R. VANDERSTEENE, R. MARSBOOM: Mutagenicity tests with mebendazole in the mouse  
Mutat. Res. 26 (1974) 427 - 430
- LEROY, F., C. BOGAERT, J. VAN HOECK: DNA-replication and accelerated chain growth in estrogen-stimulated uterine cells  
Nature 258 (1975) 259 - 260
- LITTLEFIELD, L.G.: Effects of DNA-damaging agents on SCE. In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol.2, Sister chromatid exchange. Alan R. Liss Inc., N.Y. (1982) 355 - 394
- LITTLEFIELD, L.G. und J.B. MAILHES: Comparison of chromosome breakages in lymphocytes and fibroblasts from control women and women taking oral contraceptives  
Fertil. and Steril. 26 (1975) 828 - 832
- LITTLEFIELD, L.G., W.E. LEVER, F.L. MILLER, K.O. GOH: Chromosome breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women, and women taking oral contraceptives  
Amer. J. Obstet. Gynec. 121 (1975) 976 - 980
- LUTZ, W.K., W. JAGGI, C. SCHLATTER: Covalent binding of diethylstilbestrol to DNA in rat and hamster lung and kidney  
Chem. Biol. Interactions 42 (1982) 251 - 257
- LYCETTE, R.R., S. WHYTE, C.J. CHAPMAN: Aneuploid effect of estradiol on cultured human synovial cells  
N.Z. Med. J. 72 (1970) 114 - 117
- LYCETTE, R.R., S. WHYTE, M. DRUMMOND: Euploidy of cultured human cervical epithelium exposed to estradiol  
N.Z. Med. J. 78 (1973) 115 - 116
- MADLE, S.: Der Test indirekter Mutagene in menschlichen Lymphozytenkulturen in vitro  
Dissertation, Freie Universität Berlin 1980

- MADLE, S.: Evaluation of experimental parameters in an S9/  
human leukocyte SCE-Test with cyclophosphamide  
Mutat. Res. 85 (1981) 347 - 356
- MADLE, S. und G. OBE: In vitro testing of an indirect muta-  
gen (cyclophosphamide) with human leukocyte cultu-  
res: activation with liver microsomes and use of a  
dialysis bag  
Mutat. Res. 56 (1977) 101 - 104
- MADLE, S. und G. OBE: Methods for analysis of the mutageni-  
city of indirect mutagens/carcinogens in eukaryotic  
cells  
Hum. Genet. 56 (1980) 7 - 20
- MADLE, S. und G. OBE: The use of rat liver perfusion to de-  
tect indirect mutagens/carcinogens in human leuko-  
cytes in vitro  
Arzneim. Forsch./Drug Res. 31 (1981) 822 - 824
- MAKITA, T., Y. HASHIMOTO, T. NOGUCHI: Mutagenic, cytogenic  
and teratogenic studies on thiophanate-methyl  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 24 (1973) 206 - 215
- MALKOVA, J., K. MICHALOVA, T. PRIBYL, V. SCHREIBER: Chromo-  
somal changes in rat pituitary and bone marrow in-  
duced by long-term estrogen administration  
Neoplasma 24 (1977) 277 - 284
- MAMBER, S.W., V. BRYSON, S.E. KATZ: The Escherichia coli WP2  
/ WP100 rec assay for detection of potential chemi-  
cal carcinogens  
Mutat. Res. 119 (1983) 135 - 144
- MARTIN, C.N., A.C. MC DERMID, R.C. GARNER: Testing of known  
carcinogens and noncarcinogens for their ability to  
induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells  
Cancer Res. 38 (1978) 2621 - 2627
- MARTINDALE, The extra pharmacopoeia, 28<sup>th</sup> edition  
J.E.F. Reynolds (Hrsg.)  
The Pharmaceutical Press, London (1982)
- MARX, J.L.: Do tumor promoters affect DNA after all?  
Science 219 (1983) 158 - 159
- MATSUOKA, A., M. HAYASHI, M. ISHIDATE jr.: Chromosomal aber-  
ration tests on 29 chemicals combined with S9-mix in  
vitro  
Mutat. Res. 66 (1979) 277 - 290

- MATTEI, M.G., J.F. MATTEI, M. GUICHAOUA, F. GIRAUD: Partial inversion of the secondary constriction of chromosome 9. Does it exist?  
Human Genet. 59 (1981) 310 - 316
- MATTON-VAN LEUVEN, M-TH., M. THIERY, S. DE BIE: Cytogenetic evaluation of patients in relation to the use of oral contraception  
Contraception 10 (1974) 25 - 38
- MC CANN, J. und B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals: Discussion  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73 (1976) 950 - 954
- MC CANN, J., E. CHOI, E. YAMASAKI, B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test. Assay of 300 chemicals  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 (1975) 5135 - 5139
- MC FEE, A.F. und M.N. SHERILL: Species variation in BrdUrd-induced sister-chromatid exchanges  
Mutat. Res. 62 (1979) 131 - 138
- MC GAUGHEY, R.W.: The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17 $\beta$  on meiotic maturation  
Endocrinology 100 (1977) 39 - 45
- MC KERNS, K.W.: Hormones and cancer  
Academic Press, N.Y., London (1974)
- MC LACHLAN, J.A.: Prenatal exposure to diethylstilbestrol in mice: toxicological studies  
J. Toxic. Environ. Health 2 (1977) 527 - 537
- MC LACHLAN, J.A., A. WONG, G.H. DEGEN, J.C. BARRETT: Morphological and neoplastic transformation of syrian hamster embryo fibroblasts by Diethylstilbestrol and its analogs  
Cancer Res. 42 (1982) 3040 - 3045
- MC QUARRIE, H.G., C.D. SCOTT, H.S. ELLSWORTH, J.W. HARRIS, R.A. STONE: Cytogenetic studies on women using oral contraceptives and their progeny  
Amer. J. Obstet. Gynec. 108 (1970) 659 - 665
- MEHTA, R.D. und R.C. VON BORSTEL: Mutagenicity of diethylstilbestrol in *Saccharomyces cerevisiae* (Abstract 11<sup>th</sup> annual meeting EMS)  
Environ. Mutagen. 2 (1980) 281

- MEHTA, R.D. und R.C. VON BORSTEL: Genetic activity of diethylstilbestrol in *Saccharomyces cerevisiae*. Enhancement of mutagenicity by oxidizing agents  
Mutat. Res. 92 (1982) 49 - 61
- MELTZ, M.L., N.J. WHITTAM, R.L. PURDY: Induction of mutagenicity and DNA single-strand breakage in mammalian cells by diethylstilbestrol  
Abstract 10<sup>th</sup> Annual Meeting EMS (USA) (1979)
- MERCK-INDEX, The, An encyclopedia of chemicals and drugs  
9<sup>th</sup> edition  
Merck and Co., Rathway, N.J., USA (1976)
- METZLER, M. und J.A. MC LACHLAN: Diethylstilbestrol metabolic transformation in relation to organ specific tumor manifestation  
Mechanism of Toxic Action on some target organs  
Arch. Toxicol. Suppl. 2 (1979) 275 - 280
- MEYNE, J. und M.S. LEGATOR: Clastogenic effects of transplantal exposure of mouse embryos to nitrogen mustard or cyclophosphamide  
Teratogen. Carcinogen. Mutagen. 3 (1983) 281 - 287
- MICHALOPOULOS, G., S.C. STROM, A.D. KLIGERMAN, G.P. IRONS, D.L. NOVICKI: Mutagenesis induced by procarcinogens at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus of human fibroblasts cocultured with rat hepatocytes  
Cancer Res. 41 (1981) 1873 - 1878
- MILLS, J., N. BISHUN, D. WILLIAMS, R.W. RAVEN: Chromosomes and oral contraceptives: Aberrations in relation to neoplasia  
Clin. Oncol. 1 (1975) 141 - 147
- MOGI, M. und M. WATANABE: Chromosomal aberration test in vitro with a chinese hamster fibroblast cell line on endogenous substances (Abstract: Proceedings of the 4<sup>th</sup> International Symposium on Chromosome Mutations: Their potential relevance to genetic risks in man, Kyoto 1981)  
Cytogenet. Cell Genet. 33 (1982) 123
- MOLINA, L., S. RINKUS, M.S. LEGATOR: Evaluation of the micronucleus procedure over a 2-year period  
(Abstract 8<sup>th</sup> Annual meeting A.E.M.S. 1977)  
Mutat. Res. 53 (1978) 125

- MORGAN, W.F. und P.E. CROSSEN: Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes  
Mutat. Res. 81 (1981) 395 - 402
- MORIMOTO, K.: Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes by microsomal activation of benzene  
Cancer Res. 43 (1983) 1330 - 1334
- MORIMOTO, K., S. WOLFF, A. KOIZUMI: Induction of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes by microsomal activation of benzene metabolites  
Mutat. Res. 119 (1983) 355 - 360
- MORIYA, M., T. OHTA, K. WATANABE, T. MIYAZAWA, K. KATO, Y. SHIRASU: Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems  
Mutat. Res. 116 (1983) 185 - 216
- MOYLE, W.R. und R.O. GREEP: Steroid secreting tumors as models in endocrinology. In: K.W. Mc Kerns (Hrsg.), Hormones and cancer  
Academic Press, N.Y., London (1974) 329 - 359
- MUELLER, R. und C. RITTER: Cytogenetic studies of women during and after use of hormonal contraceptives  
Zbl. Gynäk. 100 (1978) 347 - 354
- MURAKAMI, M. und J.I. FUKAMI: The binding of steroid hormones and diethylstilbestrol to proteins of human cells in culture  
Arch. Toxicol. 53 (1983) 245 - 248
- MURTHY, P.B.K., K. PREMA: Sister-chromatid exchanges in oral contraceptive users  
Mutat. Res. 68 (1979) 149 - 152
- MURTHY, P.B.K., K. PREMA: Further studies on sister-chromatid exchange frequency in users of hormonal contraceptives  
Mutat. Res. 119 (1983) 351 - 354
- NAGAO, M., N. MORITA, T. YAHAGI, M. SHIMIZU, M. KUROYANAGI, M. FUKUOKA, K. YOSHIHIRA, S. NATORI, T. FUJINO, T. SUGIMURA: Mutagenesis of 61 flavonoids and 11 related compounds  
Environ. Mutagen. 3 (1981) 401 - 419

- NAGASAWA, H. und J.B. LITTLE: Effect of tumor promoters, protease inhibitors, and repair processes on X-ray-induced sister chromatid exchanges in mouse cells  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76 (1979) 1943 - 1947
- NAGASAWA, H. und J.B. LITTLE: Factors influencing the induction of sister-chromatid exchanges in mammalian cells by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)  
Carcinogenesis 2 (1981) 601 - 607
- NAGL, W.: Zellkern und Zellzyklen: Molekularbiologie, Organisation und Entwicklungsphysiologie der Desoxyribonukleinsäure und des Chromatins  
Ulmer Verlag, Stuttgart, (1976)
- NATARAJAN, A.T. und G. OBE: Screening of human populations for mutations induced by environmental pollutants: use of human lymphocyte system  
Ecotox. Environ. Safety 4 (1980) 468 - 481
- NATARAJAN, A.T. und A.C. VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN: Mutagenic activity of 20 coded compounds in chromosome aberrations/sister chromatid exchanges assay using chinese hamster ovary (CHO) cells. In: F.J. De Serres und J. Ashby (Hrsg.) Progress in mutation research Vol. 1 Evaluation of short-term tests for carcinogenesis. Elsevier/North Holland, N.Y., Amsterdam, Oxford (1981) 551 - 559
- NATARAJAN, A.T., A.D. TATES, P.P.W. VAN BUUL, M. MEIJERS, N. DE VOGEL: Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in microsomal system in vitro  
I. Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat-liver microsomes  
Mutat. Res. 37 (1976) 83 - 90
- NEEL, J.V.: Mutation and disease in humans. In: V.K. Mc Elheny, S. Abrahamson (Hrsg.) Banbury Report 1. Assessing chemical mutagens: The risk to humans  
Cold Spring Harbor Laboratory (1979) 7 - 26
- NERI, G., B. TEDESCHI, S. SANFILIPPO: Partial inversion of the secondary constriction of chromosome 9: it exists  
Hum. Genet. 61 (1982) 80 - 81

- NIELSEN, J., K.B. HANSEN, I. SILLESEN, P. VIDEBECH: Chromosome abnormalities in newborn children. Aetiological aspects  
Hereditas 96 (1982) 109 - 117
- NOLLER, K.L. und L.T. KURLAND: Study of prenatal DES exposure and its consequences in Rochester, Minnesota  
J. Toxicol. Environ. Health, Suppl. 1 (1976) 1 - 11
- OBE, G.: Mutagenic activity of ethanol. In: K.Eriksson, J.D. Sinclair, K.Kilamaa (Hrsg.) Animal models in alcohol research  
Academic Press, London (1981)
- OBE, G. und B. BEEK: The human leukocyte test system. VII. Further investigations concerning micronucleus-derived premature chromosome condensation  
Humangenetik 30 (1975) 143 - 154
- OBE, G. und B. BEEK: Trenimon: biochemical, physiological and genetic effects on cells and organisms  
Mutat. Res. 65 (1979) 21 - 70
- OBE, G. und B. BEEK: The human leukocyte test system. In: F.J. De Serres und A. Hollaender (Hrsg.) Chemical mutagens. Principles and methods for their detection. Vol.7  
Plenum Press, New York, London (1982) 337 - 400
- OBE, G. und H. RISTOW: Acetaldehyd but not alcohol induces sister chromatid exchanges in chinese hamster cells in vitro  
Mutat. Res. 56 (1977) 211 - 213
- OBE, G. und H. RISTOW: Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol  
Mutat. Res. 65 (1979) 229 - 259
- OBE, G. und A.T. NATARAJAN: Umweltbedingte Mutationen beim Menschen  
Kliniker 9 (1980) 271 - 289
- OBE, G. und S. MADLE: Prüfung der Mutagenität von Medikamenten beim Menschen  
Prax. Pneumol. 35 (1981) 1027 - 1033 (Sonderheft 1)
- OBE, G., B. BEEK, G. DUDIN: The human leukocyte system V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures  
Humangenetik 28 (1975) 295 - 302

- OBE, G., B. BEEK, R. SLACIK-ERBEN: The use of the human leucocyte test system for the evaluation of potential mutagens. (Proceedings of the European Society of Toxicology Vol. XVII)  
Excerpta Med. Intern. Congr. Ser. No. 376 (1976)  
118 - 126
- OENFELT, A. und I. KLASTERSKA: Spindle disturbances in mammalian cells. II. Induction of viable aneuploid/polyploid cells and multiple chromatid exchanges after treatment of V 79 chinese hamster cells with carbaryl. Modifying effects of glutathione and S9  
Mutat. Res. 119 (1983) 319 - 330
- OENFELT, A. und I. KLASTERSKA: Sister-chromatid exchanges and thioguanine resistance in V79 Chinese hamster cells after treatment with the aneuploidy-inducing agent Carbaryl +/- S9 Mix  
Mutat. Res. 125 (1984) 269 - 274
- OLMSTEDT, J.B. und G.G. BORISY: Characterization of microtubule assembly in porcine extracts by viscometry  
Biochemistry 12 (1973) 4282 - 4289
- OSTERLOH, J., G. LETZ, S. POND, C. BECKER: An assessment of the potential testicular toxicity of 10 pesticides using the mouse sperm morphology assay  
Mutat. Res. 116 (1983) 407 - 415
- PAIKA, I.J., M.T. BEAUCHESNE, M. RANDALL, R.R. SCHRECK, S.A. LATT: In vivo SCE analysis of 20 coded compounds. In: F.J. De Serres und J. Ashby (Hrsg.) Progress in mutation research Vol. 1 Evaluation of short-term tests for carcinogenesis.  
Elsevier/North Holland, N.Y., Amsterdam, Oxford (1981) 673 - 681
- PAINTER, R.B.: A replication model for sister chromatid exchange. In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol.2, Sister chromatid exchange.  
Alan R. Liss Inc., N.Y. (1982) 175 - 193
- PARADI, E.: Mutagenicity of some contraceptive drugs in *Drosophila melanogaster*  
Mutat. Res. 88 (1981) 175 - 178
- PARDUE, M.L. und J.G. GALL: Chromosomal localization of mouse satellite DNA  
Science 168 (1970) 1356 - 1358

- PARRY, E.M., N. DANFORD, J.M. PARRY: Differential staining of chromosome and spindle and its use as an assay for determining the effect of diethylstilbestrol on cultured mammalian cells  
Mutat. Res. 105 (1982) 243 - 252
- PARRY, E.M., N. DANFORD, J.M. PARRY: Determination of the effect of diethylstilbestrol on cultured mammalian cells by differential staining of chromosomes and spindle  
Environ. Mutagen. (1983) 250 - 251
- PARRY, J.M.: The detection of chromosome non-disjunction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Hrsg.) Progress in Genetic Toxicology  
Elsevier/North Holland (1977) 223 - 229
- PARRY, J.M., E.M. PARRY, J.C. BARRETT: Tumor promoters induce mitotic aneuploidy in yeast  
Nature 294 (1981) 263 - 265
- PERRY, P.E.: Induction of sister-chromatid exchanges (SCEs) by thymidine and the potentiation of mutagen induced SCEs in chinese hamster ovary cells  
Mutat. Res. 109 (1983) 219 - 229
- PERRY, P. und S. WOLFF: New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids  
Nature 251 (1974) 156 - 158
- PERRY, P. und H.J. EVANS: Cytological detection of mutagen/carcinogen exposure by sister chromatid exchange  
Nature 258 (1975) 121 - 125
- PIENTA, R.J.: Transformation of syrian hamster embryo cells by diverse chemicals and correlation with their reported carcinogenic and mutagenic activities. In: F.J. De Serres und A. Hollaender (Hrsg.) Chemical mutagens. Principles and methods for their detection Vol. 6  
Plenum Press, N.Y., London (1980) 175 - 202
- PRASAD, P.R. und Z.A. HAIDER: Cytomorphology of steroid-induced root tumors  
Mutat. Res. 103 (1982) 25 - 28

- PROBST, G.S., R.E. MC MAHON, L.E. HILL, C.Z. THOMPSON, J.K. EPP, S.B. NEAL: Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: a comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds  
Environ. Mutagen. 3 (1981) 11 - 32
- RADMAN, M. und A.R. KINSELLA: Chromosomal events in carcinogenic initiation and promotion: implications for carcinogenicity testing and cancer prevention strategies  
Int. Agency Res. Cancer Sci. Publ. 27 (1980) 75 - 90
- RAO, K.P. und M.S. RAO: Screening of Ovaral and Lyndiol for genetic effects in *D. melanogaster*  
Dros. Info. Serv. 50 (1973) 115
- RAO, P.N.: Estradiol-induced mitotic delay in HeLa cells: reversal by calcium chloride and putrescine  
Exp. Cell Res. 57 (1969) 230 - 234
- RAO, P.N. und J. ENGELBERG: Structural specificity of estrogens in the induction of mitotic chromatid non-disjunction in HeLa cells  
Exp. Cell Res. 48 (1967) 71 - 81
- RENNER, H.W. und R. MÜNZNER: Genotoxicity of cocoa examined by microbial and mammalian systems  
Mutat. Res. 103 (1982) 275 - 281
- RICE-WRAY, E., H. MARQUEZ-MONTER, J. GORODOVSKY: Chromosomal studies in children born to mothers who previously used hormonal contraceptives  
Contraception 1 (1970) 81 - 84
- RICHMOND, D.V. und A. PHILLIPS: The effect of benomyl and carbendazim on mitosis in hyphae of *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. and roots of *Allium cepa* L.  
Pestic. Biochem. Physiol. 5 (1975) 367 - 379
- RICHMOND, D.V. und R.J. PRING: Some cytological effects of systemic fungicides on fungi and plants  
Neth. J. Plant Path. 83 (Suppl.1) (1977) 403 - 410
- RIDEG, K. und R. IMRE: Dominant - lethal studies on methyl -2-benzimidazole carbamate in male rats (Abstract of the 11<sup>th</sup> EEMS, Budapest 1981)  
Mutat. Res. 97 (1982) 217

- RIEDEL, L. und G. OBE: Trenimon-induced SCEs and structural chromosomal aberrations in early- and late dividing lymphocytes  
Mutat. Res. 73 (1980) 125 - 131
- RIEGER, R.: Die Genommutationen (Ploidiemutanten)  
VEB G. Fischer Verlag, Jena, (1963)
- RIEGER, R., A. Michaelis, M.M. GREEN: Glossary of genetics and cytogenetics (4<sup>th</sup> edition)  
Springer Verl. Berlin, Heidelberg, N.Y. (1976)
- ROBISCH, G., O. SCHIMMER, W. GÖGGELMANN: Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*  
Mutat. Res. 105 (1982) 201 - 204
- RÖHRBORN, G. und I. HANSMANN: Oral contraceptives and chromosome segregation in oocytes of mice  
Mutat. Res. 26 (1974) 535 - 544
- RÜDIGER, H.W., F. HAENISCH, M. METZLER, F. OESCH, H.R. GLATT: Metabolites of diethylstilbestrol induce sister chromatid exchange in human cultured fibroblasts  
Nature 281 (1979) 392 - 394
- RUSSEL, L.B. und B.E. MATTER: Whole mammal mutagenicity tests: Evaluation of five methods  
Mutat. Res. 75 (1980) 279 - 302
- RUZICKSKA, P., S. PETER, A. CZEIZEL: Studies on the chromosomal mutagenic effect of benomyl in rats and humans (Abstract of the 4<sup>th</sup> EEMS, Heidelberg)  
Mutat. Res. 29 (1975) 201
- SALAMONE, M., J. HEDDLE, E. STUART, M. KATZ: Towards an improved micronucleus test. Studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene  
Mutat. Res. 74 (1980) 347 - 356
- SALAMONE, M.F., J.A. HEDDLE, M. KATZ: Mutagenic activity of 41 compounds in the in vivo micronucleus assay. In: F.J. De Serres und J. Ashby (Hrsg.) Progress in mutation research Vol. 1, Evaluation of short-term tests for carcinogenesis.  
Elsevier/North Holland, N.Y., Amsterdam, Oxford (1981) 686 - 697
- SALMINEN, S. und P. KIVELÄ-IKONEN: The toxicity of benomyl-Regulatory actions in Finland. (Abstract)  
12<sup>th</sup> Annual Meeting EEMS, Dipoli, Finland (1982)

- SANKARANARAYANAN, K.: The role of non-disjunction in aneuploidy in man. An overview  
Mutat. Res. 61 (1979) 1 - 28
- SAWADA, M. und M. ISHIDATE jr.: Colchicine-like effect of diethylstilbestrol (DES) on mammalian cells in vitro  
Mutat. Res. 57 (1978) 175 - 182
- SCHMID, W.: The micronucleus test  
Mutat. Res. 31 (1975) 9 - 15
- SCHMID, W.: The micronucleus test for cytogenetic analysis.  
In: A. Hollaender (Hrsg.) Chemical Mutagens. Principles and methods for their detection Vol. IV  
Plenum Press, N.Y., London (1976) 31 - 53
- SCHÖNEICH, J., K. BECKER, R. BRAUN: Investigation on the mutagenic activity of STS 557  
Exp. Clin. Endocrin. 81 (1983) 210 - 216
- SCHUPPLER, J. und P. GÜNZEL: Liver tumors and steroid hormones in rats and mice  
Arch. Toxic. Suppl. 2 (1979) 181 - 195
- SCHUPPLER, J., R. SCHULTE-HERMANN, I. TIMMERMANN-TROSIENER, P. GÜNZEL: Proliferative liver lesions and sex steroids in rats  
J. Toxicol. Path. 10 (1982) 132 - 144
- SCHUPPLER, J., J. DAMME, R. SCHULTE-HERMANN: Assay of some endogeneous and synthetic sex steroids for tumor-initiating activity in rat liver using the Solt-Farber System  
Carcinogen. 4 (1983) 239 - 241
- SCHVARTZMAN, J.B. und R.R. TICE: 5-bromodeoxyuridine and its role in the production of sister chromatid exchange.  
In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol. 2 Sister Chromatid Exchange  
A.R. Liss Inc., N.Y. (1982) 123 - 134
- SCOTT, B.R., G.L. DORN, E. KÄFER, R. STAFFORD: Aspergillus nidulans: systems and results of tests for the induction of mitotic segregation and mutation. II. Haploid assay systems and the overall response of all systems  
Mutat. Res. 98 (1982) 49 - 94

- SEILER, J.P.: The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. I. Forward and reverse mutations in *Salmonella typhimurium* caused by benzimidazole and some of its derivatives  
Mutat. Res. 15 (1972) 273 - 276
- SEILER, J.P.: Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds  
Mutat. Res. 32 (1975) 151 - 168
- SEILER, J.P.: The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and in the chinese hamster  
Mutat. Res. 40 (1976) 339 - 348
- SEILER, J.P.: Apparent and real thresholds: a study on two mutagens. In: D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Hrsg.) Progress in genetic toxicology  
Elsevier/North Holland Biomedical Press (1977)  
233 - 238
- SEROVA, J.A. und Y.Y. KERKIS: Cytogenetic effect of some steroid hormones and change in the activity of lysosomal enzymes in vitro  
Sov. Genet. 10 (1974) 387 - 392
- SHAPIRO, L.R., Z.R. GRAVES, K. HIRSCHHORN: Oral contraceptives and in vivo cytogenetic studies  
Obstet. Gynec. 39 (1972) 190 - 192
- SHAW, C.R. und N. LEAL: How do we know what causes cancer?  
Texas Rep. Biol. Med. 37 (1978) 21 - 25
- SHERMAN, H., R. CULIK, R.A. JACKSON: Reproduction, teratogenic, and mutagenic studies with benomyl  
Toxicol. Appl. Pharmacol. 32 (1975) 305 - 315
- SIEBERT, D., F.K. ZIMMERMANN, E. LEMPERLE: Genetic effects of fungicides  
Mutat. Res. 10 (1970) 533 - 543
- SINA, J.F., C.L. BEAN, G.R. DYSART, V.I. TAYLOR, M.O. BRADLEY: Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential  
Mutat. Res. 113 (1983) 357 - 391
- SINGH, O.S. und D.H. CARR: A study of the effects of certain hormones on human cells in culture  
Can. Med. Ass. J. 103 (1970) 349 - 350

- SMITH, G.R., M.L. GURSON, A.J. RIDELL, A.D. PERRIS: Inhibitory action of estrogen on calcium induced mitosis in rat bone marrow and thymus  
J. Endocrin. 65 (1975) 45 - 53
- SNOPE, A.J. und J.M. RARY: Cell cycle duration and sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes  
Mutat. Res. 63 (1979) 345 - 349
- SORA, S., M. CRIPPA, G. LUCCINI: Disomic and diploid meiotic products in *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of vincristine, adriamycin, bleomycin, mitomycin C and cyclophosphamide  
Mutat. Res. 107 (1983) 249 - 264
- SPEAKMAN, J.B. und H.I. NIRENBERG: Mutagenicity of methyl benzimidazole-2-yl carbamate (MBC) towards *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter and *Cladosporium cucumerinum* Ellis and Arth  
Mutat. Res. 88 (1981) 45 - 51
- SPEIT, G.: Effects of temperature on sister chromatid exchanges  
Hum. Genet. 55 (1980) 333 - 336
- SPEIT, G., M. WOLF, W. VOGEL: The SCE-inducing capacity of vitamin C: investigations in vitro and in vivo  
Mutat. Res. 78 (1980) 273 - 278
- STENCHEVER, M.A., F.J.A. JARVIS, N.K. KREGER: Effect of selected estrogens and progestins on human chromosomes in vitro  
Obstet. Gynec. 34 (1969) 249 - 251
- STICH, H.F., W. STICH, M.P. ROSIN, W.D. POWRIE: Clastogenic activity of caramel and caramelized sugars  
Mutat. Res. 91 (1981) 129 - 136
- STICH, H.F., W. STICH, B.B. PARIDA: Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers  
Cancer Letters 17 (1982) 125 - 134
- STRAUS, D.S.: Somatic mutation, cellular differentiation, and cancer causation  
J. Nat. Cancer Inst. 67 (1981) 233 - 241

- STYLES, J.A. und R. GARNER: Benimidazolecarbamate methyl ester - Evaluation of its effects in vivo and in vitro  
Mutat. Res. 26 (1974) 177 - 187
- SUGIMURA, T., T. KAWACHI, T. MATSUSHIMA, M. NAGAO, S. SATO, T. YAHAGI: Critical review of submammalian systems for mutagenic detection. In: D. Scott, B.A. Bridges, F.H. Sobels (Hrsg.) Progress in genetic toxicology Elsevier/North Holland (1977) 125 - 140
- SUMNER, A.T.: A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin  
Exp. Cell Res. 75 (1972) 304 - 306
- SUMNER, A.T., H.J. EVANS, R.A. BUCKLAND: New technique for distinguishing between human chromosomes  
Nature New Biology 232 (1971) 31 - 32
- TANOOKA, H.: Development and applications of Bacillus subtilis test systems for mutagens involving DNA-repair deficiency and suppressible auxotrophic mutations  
Mutat. Res. 42 (1977) 19 - 32
- TAPER, H.S.: The effect of estradiol 17 $\beta$ -phenylpropionate and estradiol benzoate on n-nitrosomorpholine induced liver carcinogenesis in ovariectomised female rats  
Cancer 42 (1978) 462 - 467
- TAUBERT, H.D. und H. KUHL: Kontrazeption mit Hormonen  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, N.Y. (1981)
- TENCHINI, M.L., A. MOTTURA, L. DECARLI: Studies on the induction of mitotic non disjunction in human lymphocytes (Abstract 10<sup>th</sup> Annual Meeting EEMS 1980)  
Mutat. Res. 85 (1981) 227
- TENCHINI, M.L., A. MOTTURA, M. VELICOGNA, M. PESSINA, G. RAINALDI, L. DECARLI: Double Y as an indicator in a test of mitotic non disjunction in cultured human lymphocytes  
Mutat. Res. 121 (1983) 139 - 146
- THOMPSON, K.V.A. und R. HOLLIDAY: The longevity of diploid and polyploid human fibroblasts  
Exp. Cell Res. 112 (1978) 281 - 287

- TICE, R., E.L. SCHNEIDER, J.M. RARY: The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics  
Exp. Cell Res. 102 (1976) 232 - 236
- TIMSON, J.: Effect of testosterone on the division of phyto-hemagglutinin stimulated human lymphocytes in vitro  
Wilhelm Roux Arch. Entwickl.-Mech. Org. 162 (1969,a) 95 - 96
- TIMSON, J.: Chromosomes and an oral contraceptive (Lyndiol 2-5)  
J. Reprod. Fert. 19 (1969,b) 581 - 583
- TOPHAM, J.C.: The detection of carcinogen-induced sperm head abnormalities in mice  
Mutat. Res. 69 (1979) 149 - 155
- TRAUT, H.: The solvent dimethylsulfoxide (DMSO) does not induce aneuploidy in oocytes of *Drosophila melanogaster*  
Environ. Mutagen. 5 (1983) 273 - 277
- TROSKO, J.E., C.C. CHANG, L.P. YOTTI, E.H.Y. CHU: Effect of phorbol myristate on the recovery of spontaneous and ultraviolet light-induced 6-thioguanine and ouabain-resistant chinese hamster cells  
Cancer Res. 37 (1977) 188 - 193
- TS'O, P.O.P. und P. LU: Interaction of nucleic acids.  
1. Physical binding of thymine, adenine, steroids and aromatic hydrocarbons to nucleic acids  
Proc. Nat. Acad. Sci USA 51 (1964) 17 - 24
- TSUCHIMOTO, T. und B.E. MATTER: Comparison of micronucleus test and chromosome examination in detecting potential chromosome mutagens (Abstract of the 6<sup>th</sup> Annual Meeting EEMS, 1976)  
Mutat. Res. 46 (1977) 240
- TSUCHIMOTO, T. und B.E. MATTER: Activity of coded compounds in the micronucleus test. In: F.J. De Serres und J. Ashby (Hrsg.) Progress in mutation research Vol. 1 Evaluation of short-term tests for carcinogenesis.  
Elsevier/North Holland, N.Y., Amsterdam, Oxford (1981) 705 - 711

- VALADAUD-BARRIEU, D.: Un test d'induction de micronoyou sur  
Allium sativum; differentiation de substances clas-  
togenes et mitoclasiques  
Mutat. Res. 119 (1983) 55 - 58
- VIG, B.K.: Sequence of centromeric separation: role of cen-  
tromeric heterochromatin  
Genetics 102 (1982) 795 - 806
- WALLACE, M.E., F.M. BADR, R.S. BADR: Studies in mice on the  
mutagenicity of two contraceptive drugs  
J. Med. Genet. 16 (1979) 206 - 209
- WEGNER, R.-D.: Cytogenetische Untersuchungen zur Synchroni-  
sation diploider und permanenter Zellkulturen mit  
Distickstoffoxid (Lachgas)  
Dissertation, Freie Universität Berlin (1979)
- WEINBERG, R.A.: Alteration of the genomes of tumor cells  
Cancer 52 (1983) 1971 - 1975
- WEISBURGER, J.H. und G.M. WILLIAMS: Carcinogen testing: Cur-  
rent problems and new approaches  
Science 214 (1981) 401 - 407
- WEISE, W.: Oral contraceptives during pregnancy and fetal  
chromosome findings  
Zbl. Gynäk. 97 (1975) 1390 - 1393
- WHEELER, G.P., B.J. BOWDON, J.A. WERLINE, D.J. ADAMSON, C.J.  
TEMPLE jr.: Inhibition of mitosis and anticancer activity  
against experimental neoplasms by ethyl 5-amino-  
1,2-dihydro-3-((N-methylanilino) methyl)-pyrido  
(3,4- b) pyrazin-7-ylcarbamate (NSC 181 928)  
Cancer Res. 42 (1982) 791 - 798
- WIDMEYER, M.A. und E.L. SHAVER: Estrogen, progesterone and  
chromosome abnormalities in rabbit blastocysts  
Teratology 6 (1972) 207 - 214
- WILLIAMS, D.L., J.W. RUNYAN, A.A. HAGEN: Meiotic chromosome  
alterations produced by progesterone  
Nature 220 (1968) 1145 - 1147
- WILLIAMS, D.L., A.A. HAGEN, J.W. RUNYAN: Chromosome altera-  
tions produced in germ cells of dogs by progesterone  
J. Lab Clin. Med. 77 (1971) 417 - 429
- WILLIAMS, D.L., J.W. RUNYAN, A.A. HAGEN: Progesterone-indu-  
ced alterations of oogenesis in the chinese hamster  
J. Lab Clin. Med. 79 (1972) 972 - 977

- WILLIAMS, G.M., M.F. LAPSIA, V.C. DUNKEL: Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of coded carcinogens and noncarcinogens  
Mutat. Res. 97 (1982) 359 - 370
- WOJCIECHOWSKI, J.P., P. KAUR, P.S. SABHARWAL: Comparison of metabolic systems required to activate pro-mutagens /carcinogens in vitro for sister chromatid exchange studies  
Mutat. Res. 88 (1981) 89 - 97
- WOLFF, S.: Sister chromatid exchange  
Annual Rev. Genet. 11 (1977) 183 - 201
- WOLFF, S.: Sister chromatid exchange as a sensitive test for mutagenic carcinogens (Abstract)  
Cytogenet. Cell Genet. 33 (1982) 123
- WOLFF, S. und W.F. MORGAN: Modulating factors in sister chromatid exchange induction by mutagenic carcinogens. In: A.A. Sandberg (Hrsg.) Progress and topics in cytogenetics Vol.2, Sister Chromatid Exchange  
A.R. Liss Inc. N.Y. (1982) 515 - 533
- YAGER, J.D. und R. YAGER: Oral contraceptive steroids as promoters of hepatocarcinogenesis in female Sprague Dawley rats  
Cancer Res. 40 (1980) 3680 - 3685
- YAMAFUJI, K., S. IIJAMA, K. SHINOHARA: Mode of action of steroid hormones on deoxyribonucleic acid  
Enzymologia 40 (1971) 259 - 264
- YAMAMOTO, K. und Y. KIKUCHI: Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei  
Mutat. Res. 90 (1981) 163 - 173
- YUNIS, J.J.: The chromosomal basis of human neoplasia  
Science 221 (1983) 227 - 236

## TABELLE 5:

## Übersicht über die Ergebnistabellen

- I) Negativ- und Positivkontrollen  
(Tabellen 6 - 14)
- II) Vergleich verschiedener Chargen S9-Fraktion (CP-KO)  
(Tabellen 15 und 16)
- III) Testsubstanzen
  - a) MBC (Tabellen 17 - 21)
  - b) DES (Tabellen 22 - 27)
  - c) Estradiol (Tabellen 28 - 32)
  - d) Estron (Tabellen 33 - 37)
  - e) Progesteron (Tabellen 38 - 42)
  - f) Testosteron (Tabellen 43 - 47)
  - g) Androstanolon (Tabellen 48 - 52)
- IV) Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen mittels Mitosearretierung, Mikrokernen und Polyploidien  
(Tabellen 53 - 60)

Liste der Ergebnistabellen:

- ### I) Negativ- und Positivkontrollen

### Ia) Strukturelle Chromosomenaberrationen

- Tabelle 6: O-KO, ALK-KO und DMSO-KO in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (CA-)
- Tabelle 7: TREN-KO in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (CA-)
- Tabelle 8: O-KO und DMSO-KO in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+ und CA+ Dy)
- Tabelle 9: Cyclophosphamid ohne S9-Mix (CP-KO -) und mit S9-Mix (CP-KO) in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+ und CA+ Dy)

### Ib) SCE-Raten

- Tabelle 10: O-KO (Tab.10), ALK-KO und DMSO-KO (Tab.10a) in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (SCE-)
- Tabelle 11: TREN-KO in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (SCE-)

Fortsetzung TABELLE 5:

- Tabelle 12: O-KO ohne S9-Mix (Tab. 12), O-KO mit S9-Mix (Tab.12a), DMSO-KO ohne S9-Mix (Tab.12b) und DMSO-KO mit S9-Mix (Tab.12c) in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+, CA+ Dy, SCE+ und SCE+ Dy)
- Tabelle 13: CP-KO ohne S9-Mix in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+, CA+ Dy, SCE+ und SCE+ Dy)
- Tabelle 14: CP-KO mit S9-Mix in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+, CA+ Dy, SCE+ und SCE+ Dy)

II) Vergleich verschiedener Chargen S9 Fraktion

- Tabelle 15: SCE-Raten nach Behandlung mit Cyclophosphamid und verschiedenen Chargen S9-Fraktion in unterschiedlichen Konzentrationen (SCE+ 6)
- Tabelle 16: Vergleich der Aktivierungsfähigkeit von CP-KO nach unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen und verschiedenen S9-Fractionen (CA+, CA+ Dy, SCE+ und SCE+ Dy)

III) Testsubstanzen

IIIa) Methyl 2-benzimidazolcarbamat (MBC)

- Tabelle 17: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)
- Tabelle 18: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)
- Tabelle 19: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)
- Tabelle 20: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)
- Tabelle 21: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

IIIb) Diethylstilbestrol (DES)

- Tabelle 22: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)
- Tabelle 23: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)
- Tabelle 24: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)
- Tabelle 25: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-) Vergleich Spender weibl. Schwangere gegen männl.Spender

Fortsetzung TABELLE 5:

Tabelle 26: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)

Tabelle 27: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

IIIc) Estradiol

Tabelle 28: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)

Tabelle 29: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)

Tabelle 30: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)

Tabelle 31: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)

Tabelle 32: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

IIId) Estron

Tabelle 33: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)

Tabelle 34: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)

Tabelle 35: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)

Tabelle 36: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)

Tabelle 37: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

IIIe) Progesteron

Tabelle 38: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)

Tabelle 39: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)

Tabelle 40: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)

Tabelle 41: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)

Tabelle 42: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

Fortsetzung TABELLE 5:

IIIIf) Testosteron

- Tabelle 43: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)  
Tabelle 44: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)  
Tabelle 45: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)  
Tabelle 46: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)  
Tabelle 47: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

IIIIg) Androstanolon

- Tabelle 48: Strukturelle Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung (CA-)  
Tabelle 49: Strukturelle Chromosomenaberrationen mit metabolischer Aktivierung (CA+)  
Tabelle 50: SCE-Raten ohne metabolische Aktivierung (SCE-)  
Tabelle 51: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Pulsbehandlung“, CA+, CA+ Dy und SCE+)  
Tabelle 52: SCE-Raten mit metabolischer Aktivierung („Dauerbehandlung“, SCE+ Dy)

IV) Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen mittels Mitosearretierung, Mikrokernen und Polyploidien

- Tabelle 53: Mitoseindices nach Behandlung mit MBC (MI 1) und nach Behandlung mit allen 7 Testsubstanzen (MBC, DES und Steroide (MI 2)  
Tabelle 54: Mikrokern in Interphasen und Mitoseindices nach Behandlung mit MBC, DES und Estradiol, nekrotische Zellkerne (Tab.54a), (MI 3)  
Tabelle 55: C-Banden in Metaphasechromosomen und Chromozentren in Interphasekernen (MI 4 und MI 5)  
Tabelle 56: Chromozentren in Mikrokernen (MI 4 und MI 5)  
Tabelle 57: Polyploidien in 1., 2. und 3. Mitosen (MI 4 und MI 5 (Tab 57a))  
Tabelle 58: Relativer Anteil von Polyploidien in 2. und 3. Mitosen (MI 4 und MI 5)  
Tabelle 59: Bestimmung des Ploidiegrades nach 72 Std. (MI 6), 84 Std (MI 7), 96 Std. (MI 8) und 112 Std. (MI 9)  
Tabelle 60: Mitoseindices in den Versuchen MI 6 bis MI 9

A. Liste der in den Tabellen verwendeten Abkürzungen

A, männl.

bis

X, weibl. : Kennbuchstabe und Geschlecht des Blutspenders  
(Liste der Blutspender unter Punkt 2.2)

AL : Achromatische Läsion

(ALK) : Substanz in Ethanol gelöst

ALK-KO : Lösungsmittelkontrolle mit 1% Ethanol in der  
Kultur

B' : Chromatidbruch

B'' : Doppelbruch

COLC-KO : Colcemidkontrolle

CP-KO : Cyclophosphamidkontrolle

Dic : dizentrisches Chromosom

DMSO-KO : Lösungsmittelkontrolle mit 1% Dimethylsulfoxid  
(DMSO) in der Kultur

Exch. : Austauschaberration (exchange)

M 1 : Mitose in 1. Teilungsphase nach Einbau von Brom-  
desoxyuridin (BUdR)

M 2 : Mitose in 2. Teilungsphase nach Einbau von BUdR

M 3 : Mitose in 3. oder nachfolgender Teilungsphase  
nach Einbau von BUdR

MK : Mikrokern

RB' : reziproke Chromatidentranslokation

RB'B'' : Triradial

SCE : Schwesterchromatidenaustausch

SE : Standardabweichung (Standard Error)

TREN-KO : Trenimonkontrolle

- : keine Zugabe von S9-Mix

+

2 N : diploider Chromosomensatz

4 N : tetraploider Chromosomensatz

8 N : oktaploider Chromosomensatz

O-KO : unbehandelte Kontrolle

B. Liste der für die Experimentalserien verwendeten Abkürzungen

- CA- : Versuche zur Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen ohne metabolische Aktivierung
- CA+ : Versuche zur Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen (und SCE-Raten) mit metabolischer Aktivierung bei direkter Zugabe von S9-Mix zu den Blutkulturen
- CA+ Dy : Versuche zur Erfassung struktureller Chromosomenaberrationen (und SCE-Raten) mit metabolischer Aktivierung bei indirekter Applikation von S9-Mix zu den Blutkulturen im Dialyseschlauch
- SCE- : Versuche zur Ermittlung der SCE-Rate ohne metabolische Aktivierung
- SCE+ : Versuche zur Ermittlung der SCE-Rate mit metabolischer Aktivierung bei direkter Zugabe von S9-Mix zu den Blutkulturen
- SCE+ Dy : Versuche zur Ermittlung der SCE-Rate mit metabolischer Aktivierung bei indirekter Applikation von S9-Mix zu den Blutkulturen im Dialyseschlauch
- MI 1 und  
MI 2 : Mitosearretierende Wirkung. Nachweis durch Bestimmung der Mitoseindices
- MI 3 : Mitosearretierung; Mikrokerne in Interphasen
- MI 4 und  
MI 5 : Mitosearretierung, Nachweis von Mikrokernen (nicht quantitativ) in Interphasen, Darstellung von C-Banden in Metaphasechromosomen, heterochromatischen Bereichen in Hauptkernen und Mikrokernen. Polyploidien in Abhängigkeit zum Proliferationsverhalten (Ploidiegrad in 1., 2. und 3. Mitosen nach Kulturbeginn
- MI 6 bis  
MI 9 : Mitosearretierung und Nachweis polyploider Metaphasen

TABELLE 6:

Negativkontrollen (O - und Lösungsmittelkontrollen). Strukturelle Chromosomenaberrationen in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (CA-), Kulturdauer 48 Stunden, Medium HAM's F10

| Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100 Meta-<br>phasen | AL  | B' | B''      | Exch. | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index |
|------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-----|----|----------|-------|-------------------------|------------------|
| O-KO       | CA- 1                  | D, männl.                          | 100                               | 2                                   | 1   | 0  | 1RB'1Dic | 3     | 5,8                     |                  |
| O-KO       | CA- 2                  | R, weibl.                          | 200                               | 1                                   | 2,5 | 0  | 0        | 2,5   | 8,4                     |                  |
| O-KO       | CA- 3                  | E, männl.                          | 100                               | 1                                   | 1   | 0  | 0        | 1     | 7,3                     |                  |
| O-KO       | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 2                                   | 0   | 1  | 0        | 1     | 7,3                     |                  |
| O-KO       | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 2                                   | 1   | 0  | 0        | 1     | 4,0                     |                  |
| O-KO       | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 2                                   | 1   | 0  | 0        | 1     | 4,1                     |                  |
| O-KO       | CA- 7                  | C, männl.                          | 100                               | 3                                   | 0   | 0  | 0        | 0     | 7,5                     |                  |
| ALK-KO     | CA- 1                  | D, männl.                          | 100                               | 1                                   | 3   | 0  | 0        | 3     | 2,0                     |                  |
| ALK-KO     | CA- 2                  | R, weibl.                          | 200                               | 1                                   | 4   | 0  | 0        | 4     | 6,2                     |                  |
| DMSO-KO    | CA- 1                  | D, männl.                          | 100                               | 0                                   | 0   | 0  | 0        | 0     | 5,2                     |                  |
| DMSO-KO    | CA- 3                  | E, männl.                          | 100                               | 2                                   | 2   | 2  | 0        | 4     | 7,3                     |                  |
| DMSO-KO    | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 0   | 0  | 0        | 0     | 5,2                     |                  |
| DMSO-KO    | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 2                                   | 0   | 1  | 0        | 1     | 3,0                     |                  |
| DMSO-KO    | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 1   | 0  | 1 RB'    | 2     | 5,6                     |                  |
| DMSO-KO    | CA- 7                  | C, männl.                          | 100                               | 1                                   | 2   | 1  | 0        | 3     | 5,1                     |                  |

TABELLE 7:

Positivkontrollen mit Trenimon. Strukturelle Chromosomenaberrationen in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (CA-), Kulturdauer 48 Stunden, Medium HAM's F10

| Trenimon-<br>konzentra-<br>tion (M) | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100 Me-<br>taphasen | B' | B'' | Exch.    | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index ohne AL |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----|-----|----------|-------------------------|--------------------------|
| $1,0 \times 10^{-8}$                | CA- 3                  | E, männl.                          | 100                               | 3                                   | 4  | 3   | 0        | 7                       | 8,0                      |
| $1,0 \times 10^{-8}$                | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 3                                   | 6  | 1   | 0        | 7                       | 3,2                      |
| $1,0 \times 10^{-8}$                | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 2                                   | 5  | 4   | 1 RB'    | 10                      | 2,3                      |
| $2,5 \times 10^{-8}$                | CA- 3                  | E, männl.                          | 100                               | 3                                   | 8  | 1   | 0        | 9                       | 5,4                      |
| $2,5 \times 10^{-8}$                | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 3                                   | 7  | 3   | 0        | 10                      | 1,7                      |
| $2,5 \times 10^{-8}$                | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 5                                   | 11 | 2   | 0        | 13                      | 1,7                      |
| $2,5 \times 10^{-8}$                | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 7                                   | 14 | 6   | 2 RB'    | 22                      | 2,6                      |
| $2,5 \times 10^{-8}$                | CA- 7                  | C, männl.                          | 100                               | 7                                   | 18 | 6   | 0        | 24                      | 3,8                      |
| $5,0 \times 10^{-8}$                | CA- 1                  | D, männl.                          | 100                               | 4                                   | 14 | 2   | 0        | 16                      | 1,7                      |
| $5,0 \times 10^{-8}$                | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 2                                   | 7  | 3   | 1 RB'    | 11                      | 1,8                      |
| $5,0 \times 10^{-8}$                | CA- 3                  | E, männl.                          | 100                               | 8                                   | 9  | 5   | 1 RB'    | 15                      | 4,3                      |
| $5,0 \times 10^{-8}$                | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 7                                   | 11 | 5   | 2RB'1Dic | 19                      | 2,5                      |
| $5,0 \times 10^{-8}$                | CA- 7                  | C, männl.                          | 100                               | 5                                   | 11 | 2   | 1 Dic    | 14                      | 1,8                      |
| $1,0 \times 10^{-7}$                | CA- 1                  | D, männl.                          | 100                               | 3                                   | 8  | 9   | 0        | 17                      | 0,7                      |
| $1,0 \times 10^{-7}$                | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 6                                   | 15 | 1   | 0        | 16                      | 1,0                      |

1  
174  
1

TABELLE 8:

Negativkontrollen (O - und Lösungsmittelkontrollen). Strukturelle Chromosomenaberrationen in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+ und CA+ Dy), Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10

| Kontrollen | S9-Mix   | Experi-    | Blutspen- | ausgewer-  | Aberrationen in 100 | Aberratio- | Mitose  |       |   |     |
|------------|----------|------------|-----------|------------|---------------------|------------|---------|-------|---|-----|
| -/+        | talserie | der und    | tete Me-  | Metaphasen | Exch.               | nen total  | index   |       |   |     |
|            |          | Geschlecht | taphasen  | AL         | B'                  | B''        | ohne AL |       |   |     |
| O-KO       | -        | CA+ 1      | V, weibl. | 100        | 2                   | 1          | 0       | 0     | 1 | 7,9 |
| O-KO       | -        | CA+ 2      | U, weibl. | 100        | 3                   | 2          | 0       | 0     | 2 | 6,8 |
| O-KO       | -        | CA+ Dy 1   | W, weibl. | 100        | 2                   | 0          | 1       | 0     | 1 | 9,5 |
| O-KO       | -        | CA+ Dy 2   | A, männl. | 100        | 0                   | 0          | 0       | 0     | 0 | 9,3 |
| O-KO       | +        | CA+ 1      | V, weibl. | 100        | 1                   | 0          | 0       | 0     | 0 | 7,8 |
| O-KO       | +        | CA+ 2      | U, weibl. | 100        | 2                   | 0          | 1       | 0     | 1 | 5,2 |
| O-KO       | +        | CA+ Dy 1   | W, weibl. | 100        | 0                   | 1          | 0       | 0     | 1 | 6,0 |
| O-KO       | +        | CA+ Dy 2   | A, männl. | 100        | 3                   | 1          | 1       | 0     | 2 | 9,1 |
| DMSO-KO    | -        | CA+ 1      | V, weibl. | 100        | 1                   | 0          | 0       | 0     | 0 | 8,2 |
| DMSO-KO    | -        | CA+ 2      | U, weibl. | 100        | 2                   | 2          | 0       | 0     | 2 | 7,1 |
| DMSO-KO    | -        | CA+ Dy 1   | W, weibl. | 100        | 2                   | 0          | 0       | 0     | 0 | 6,2 |
| DMSO-KO    | -        | CA+ Dy 2   | A, männl. | 100        | 0                   | 1          | 0       | 0     | 1 | 8,4 |
| DMSO-KO    | +        | CA+ 1      | V, weibl. | 100        | 1                   | 0          | 0       | 0     | 0 | 7,0 |
| DMSO-KO    | +        | CA+ 2      | U, weibl. | 100        | 4                   | 1          | 0       | 1 RB' | 2 | 3,3 |
| DMSO-KO    | +        | CA+ Dy 1   | W, weibl. | 100        | 2                   | 0          | 0       | 0     | 0 | 3,7 |
| DMSO-KO    | +        | CA+ Dy 2   | A, männl. | 100        | 1                   | 1          | 0       | 0     | 1 | 7,4 |

TABELLE 9:

Negativ- und Positivkontrollen mit Cyclophosphamid. Strukturelle Chromosomenaberrationen in Versuchen mit metabolischer Aktivierung (CA+ und CA+ Dy), Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10

| Cyclophosphamidkonzentration (M) | S9-Mix -/+ talserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen |    |           | Aberrationen total | Mitosen ohne AL |
|----------------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|----|-----------|--------------------|-----------------|
|                                  |                     |                            |                         | AL                             | B' | B'' Exch. |                    |                 |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>             | -                   | CA+ 1                      | V, weibl.               | 100                            | 0  | 1         | 0                  | 1               |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>             | -                   | CA+ 2                      | U, weibl.               | 100                            | 2  | 2         | 0                  | 1 Dic 3         |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>             | -                   | CA+ Dy 1                   | W, weibl.               | 100                            | 2  | 1         | 0                  | 0               |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>             | -                   | CA+ Dy 2                   | A, männl.               | 100                            | 1  | 0         | 0                  | 0               |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>             | +                   | CA+ 1                      | V, weibl.               | 100                            | 4  | 8         | 2                  | 1 RB' 11        |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>             | +                   | CA+ 2                      | U, weibl.               | 100                            | 9  | 9         | 2                  | 0 11            |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>             | +                   | CA+ Dy 1                   | W, weibl.               | 100                            | 4  | 8         | 0                  | 0               |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>             | +                   | CA+ Dy 2                   | A, männl.               | 100                            | 8  | 9         | 0                  | 0               |

8,0

4,6

4,2

6,2

5,5

3,6

6,3

8,2

TABELLE 10:

Negativkontrollen (unbehandelte Kontrollen (O-KO)), SCE-Raten in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), Kulturdauer 72 Stunden, Medium TC 199

| Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| O-KO       | SCE- 1                 | K, weibl.                          | 25                                | 5,35  | 2,3 | 11,5             | 20  | 71  | 9   |
| O-KO       | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,02  | 2,0 | 10,6             | 41  | 52  | 7   |
| O-KO       | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 4,72  | 1,8 | 7,3              | 38  | 55  | 7   |
| O-KO       | SCE- 4                 | I, männl.                          | 25                                | 5,60  | 2,4 | 5,0              | 58  | 39  | 3   |
| O-KO       | SCE- 5                 | X, weibl.                          | 25                                | 10,68 | 4,6 | 7,2              | 33  | 61  | 6   |
| O-KO       | SCE- 6                 | D, männl.                          | 50                                | 6,40  | 3,0 | 11,7             | 41  | 41  | 18  |
| O-KO       | SCE- 7                 | C, männl.                          | 25                                | 5,56  | 2,6 | 6,9              | 48  | 46  | 6   |
| O-KO       | SCE- 8                 | L, weibl.                          | 25                                | 5,56  | 2,5 | 9,3              | 46  | 44  | 10  |
| O-KO       | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 7,20  | 3,0 | 4,3              | 17  | 55  | 28  |
| O-KO       | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 5,44  | 2,6 | 4,3              | 43  | 40  | 17  |

TABELLE 10a:

Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen (ALK-KO und DMSO-KO)), SCE-Raten in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), Kulturdauer 72 Stunden, Medium TC 199

| Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| ALK-KO     | SCE- 1                 | K, weibl.                          | 25                                | 6,00  | 2,4 | 7,8              | 45  | 52  | 3   |
| ALK-KO     | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 4,96  | 2,1 | 7,3              | 40  | 50  | 10  |
| ALK-KO     | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 4,60  | 1,7 | 6,1              | 47  | 47  | 6   |
| DMSO-KO    | SCE- 1                 | K, weibl.                          | 25                                | 5,08  | 2,3 | 8,6              | 51  | 42  | 7   |
| DMSO-KO    | SCE- 4                 | I, männl.                          | 25                                | 6,20  | 4,8 | 2,7              | 57  | 28  | 15  |
| DMSO-KO    | SCE- 5                 | X, weibl.                          | 25                                | 12,80 | 4,8 | 7,2              | 33  | 55  | 12  |
| DMSO-KO    | SCE- 6                 | D, männl.                          | 50                                | 6,60  | 3,0 | 10,6             | 45  | 41  | 14  |
| DMSO-KO    | SCE- 7                 | C, männl.                          | 25                                | 5,20  | 2,1 | 5,1              | 73  | 25  | 2   |
| DMSO-KO    | SCE- 8                 | L, weibl.                          | 25                                | 7,08  | 2,9 | 5,1              | 56  | 40  | 4   |
| DMSO-KO    | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 5,68  | 2,2 | 3,8              | 43  | 40  | 17  |
| DMSO-KO    | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 5,48  | 2,2 | 3,6              | 42  | 48  | 10  |

TABELLE 11:

Positivkontrollen (Trenimonkontrollen (TREN-KO)), SCE-Raten in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), Kulturdauer 72 Stunden, Medium TC 199

| Trenimonkonzentration (M) | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| $0,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 10,52 | 2,8 | 5,5          | 48  | 48  | 4   |
| $0,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 3            | P, weibl.                  | 25                      | 18,04 | 7,2 | 3,2          | 69  | 31  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 14,72 | 5,2 | 7,9          | 50  | 48  | 2   |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 2            | S, weibl.                  | 48                      | 11,83 | 2,6 | 6,0          | 60  | 39  | 1   |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 3            | P, weibl.                  | 25                      | 24,76 | 9,2 | 3,5          | 64  | 36  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 17,84 | 4,6 | 3,9          | 54  | 35  | 11  |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 24,12 | 5,3 | 5,0          | 51  | 48  | 1   |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 6            | D, männl.                  | 25                      | 12,68 | 4,2 | 9,1          | 38  | 54  | 8   |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 9            | S, weibl.                  | 25                      | 17,08 | 6,3 | 4,6          | 35  | 44  | 21  |
| $1,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 10           | D, männl.                  | 25                      | 14,48 | 4,2 | 4,8          | 41  | 41  | 18  |

1  
179  
1

TABELLE 11a:

Positivkontrollen (Trenimonkontrollen(TREN-KO)), SCE-Raten in Versuchen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), Kulturdauer 72 Stunden, Medium TC 199

| Trenimonkonzentration (M) | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE   | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|---------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|------|--------------|-----|-----|-----|
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 26,32 | 7,9  | 2,5          | 50  | 45  | 5   |
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 31,60 | 8,3  | 5,4          | 59  | 41  | 0   |
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 6            | D, männl.                  | 42                      | 23,53 | 8,1  | 6,0          | 41  | 46  | 13  |
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 22,84 | 6,6  | 3,5          | 72  | 27  | 1   |
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 30,48 | 8,4  | 6,7          | 72  | 28  | 0   |
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 9            | S, weibl.                  | 25                      | 26,04 | 9,3  | 2,3          | 52  | 40  | 8   |
| $2,5 \times 10^{-8}$      | SCE- 10           | D, männl.                  | 25                      | 20,64 | 6,7  | 2,4          | 38  | 49  | 13  |
| $5,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 2            | S, weibl.                  | 50                      | 29,02 | 14,3 | 4,5          | 64  | 36  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-8}$      | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 33,92 | 10,8 | 3,7          | 85  | 15  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-8}$ a)   | SCE- 8            | L, weibl.                  | 0                       | -     | -    | 3,6          | 92  | 8   | 0   |

a) SCE-Analyse nicht möglich (keine verwertbaren 2.Mitosen)

TABELLE 12:

Negativkontrollen (Nullkontrollen (O-KO ohne Aktivierung)), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA<sup>+</sup>, CA<sup>+</sup> Dy) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE<sup>+</sup>, SCE<sup>+</sup> Dy)

| Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE  | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| O-KO       | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 4,16 | 1,5 | 7,9              | 48  | 52  | 0   |
| O-KO       | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 25                                | 4,68 | 1,9 | 6,8              | 91  | 9   | 0   |
| O-KO       | CA+ Dy 1               | W, weibl.                          | 25                                | 3,64 | 1,3 | 9,5              | 58  | 40  | 2   |
| O-KO       | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,60 | 2,4 | 9,3              | 38  | 58  | 4   |
| O-KO       | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 25                                | 7,52 | 2,7 | 7,7              | 13  | 75  | 12  |
| O-KO       | SCE+ 2                 | B, männl.                          | 25                                | 6,64 | 2,3 | 8,9              | 7   | 32  | 61  |
| O-KO       | SCE+ 3                 | Q, weibl.                          | 25                                | 6,56 | 3,1 | 6,4              | 17  | 53  | 30  |
| O-KO       | SCE+ Dy 1              | L, weibl.                          | 25                                | 4,36 | 1,9 | 7,0              | 21  | 57  | 22  |
| O-KO       | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 5,98 | 2,6 | 7,1              | 14  | 57  | 29  |
| O-KO       | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 4,12 | 2,1 | 6,2              | 23  | 43  | 34  |
| O-KO       | SCE+ Dy 5              | D, männl.                          | 25                                | 6,20 | 3,8 | 4,1              | 33  | 59  | 8   |

1  
181  
1

TABELLE 12a:

Negativkontrollen (Nullkontrollen (O-KO mit Aktivierung)), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA+, CA+ Dy) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE  | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| O-KO       | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 4,56 | 2,8 | 7,8         | 55  | 45  | 0   |
| O-KO       | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 5,40 | 2,7 | 5,2         | 87  | 13  | 0   |
| O-KO       | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 4,16 | 2,1 | 6,0         | 50  | 49  | 1   |
| O-KO       | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 5,84 | 3,1 | 9,1         | 36  | 64  | 0   |
| O-KO       | SCE+ 1            | L, weibl.                  | 25                      | 7,52 | 3,7 | 10,2        | 8   | 52  | 40  |
| O-KO       | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 5,32 | 2,4 | 8,3         | 9   | 26  | 65  |
| O-KO       | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 6,20 | 2,6 | 7,1         | 18  | 43  | 39  |
| O-KO       | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                      | 4,82 | 2,1 | 9,7         | 30  | 51  | 19  |
| O-KO       | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 7,42 | 3,8 | 6,7         | 10  | 45  | 45  |
| O-KO       | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 4,44 | 2,3 | 8,8         | 18  | 43  | 39  |
| O-KO       | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 25                      | 6,60 | 2,2 | 4,9         | 45  | 42  | 13  |

TABELLE 12b:

Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen (DMSO-KO ohne Aktivierung)), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA+, CA+ Dy) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE  | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO    | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 5,72 | 2,7 | 8,2          | 47  | 53  | 0   |
| DMSO-KO    | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 6,00 | 3,9 | 5,2          | 84  | 16  | 0   |
| DMSO-KO    | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 4,28 | 1,9 | 6,2          | 56  | 44  | 0   |
| DMSO-KO    | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 4,16 | 2,1 | 8,4          | 33  | 65  | 2   |
| DMSO-KO    | SCE+ 1            | L, weibl.                  | 25                      | 5,20 | 2,2 | 6,4          | 21  | 65  | 14  |
| DMSO-KO    | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,04 | 2,5 | 5,6          | 17  | 39  | 44  |
| DMSO-KO    | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 7,48 | 3,5 | 5,3          | 22  | 50  | 28  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                      | 5,20 | 2,1 | 8,8          | 50  | 44  | 6   |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 6,22 | 3,3 | 6,9          | 16  | 51  | 33  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 6,60 | 2,4 | 7,5          | 15  | 60  | 25  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 6,04 | 3,0 | 5,0          | 17  | 48  | 35  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 25                      | 7,12 | 3,9 | 4,6          | 36  | 51  | 13  |

TABELLE 12c:

Negativkontrollen (Lösungsmittelkontrollen (DMSO-KO mit Aktivierung)), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA+, CA+ Dy) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE  | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO    | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 4,60 | 2,7 | 7,0          | 57  | 41  | 2   |
| DMSO-KO    | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 5,92 | 2,2 | 3,3          | 91  | 9   | 0   |
| DMSO-KO    | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 15                      | 4,87 | 2,1 | 3,7          | 70  | 30  | 0   |
| DMSO-KO    | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 4,80 | 1,9 | 7,4          | 53  | 47  | 0   |
| DMSO-KO    | SCE+ 1            | L, weibl.                  | 50                      | 5,72 | 3,1 | 10,9         | 19  | 57  | 24  |
| DMSO-KO    | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,36 | 2,7 | 6,2          | 12  | 29  | 59  |
| DMSO-KO    | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 6,92 | 3,3 | 6,1          | 15  | 55  | 30  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                      | 5,80 | 2,2 | 6,8          | 31  | 58  | 11  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 6,52 | 3,3 | 8,3          | 9   | 59  | 32  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 6,40 | 2,6 | 9,4          | 21  | 50  | 29  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 5,52 | 2,4 | 7,8          | 22  | 41  | 37  |
| DMSO-KO    | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 25                      | 5,88 | 2,7 | 3,2          | 50  | 39  | 11  |

- 184 -

TABELLE 13:

Negativkontrollen (Positive Referenzsubstanz ohne Aktivierung (CP-KO -)), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung, Kulturdauer 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Cyclophosphamidkonzentration (M) | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE  | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ 1            | L, weibl.                  | 25                      | 5,16 | 2,7 | 7,7          | 35  | 45  | 20  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,20 | 3,5 | 6,2          | 11  | 43  | 46  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 7,36 | 3,6 | 6,9          | 21  | 49  | 30  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                      | 5,48 | 2,7 | 9,1          | 33  | 43  | 24  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 6,86 | 4,3 | 7,0          | 17  | 48  | 35  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 6,64 | 2,9 | 6,7          | 18  | 45  | 37  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 5,72 | 3,6 | 6,8          | 19  | 38  | 43  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 50                      | 6,16 | 4,1 | 4,2          | 34  | 50  | 16  |

TABELLE 13a:

Negativkontrollen (Positive Referenzsubstanz ohne Aktivierung (CP-KO -), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA+, CA+ Dy) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Cyclophosphamidkonzentration (M) | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE  | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| $1 \times 10^{-5}$               | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 4,96 | 2,5 | 8,0         | 48  | 52  | 0   |
| $1 \times 10^{-5}$               | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 5,92 | 3,8 | 4,6         | 91  | 9   | 0   |
| $1 \times 10^{-5}$               | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 4,84 | 2,6 | 6,8         | 36  | 63  | 1   |
| $1 \times 10^{-5}$ a)            | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | -                       | -    | -   | 7,5         | 26  | 69  | 5   |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,44 | 3,5 | 5,6         | 11  | 37  | 52  |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 6,76 | 3,5 | 5,3         | 21  | 47  | 32  |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 6,64 | 2,9 | 6,7         | 18  | 45  | 37  |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 5,72 | 3,1 | 6,8         | 22  | 45  | 33  |
| $5 \times 10^{-5}$               | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 5,24 | 2,4 | 4,2         | 68  | 32  | 0   |
| $5 \times 10^{-5}$               | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 3,92 | 1,8 | 6,2         | 46  | 52  | 2   |

a) SCE-Rate wurde nicht ermittelt

TABELLE 14:

Positivkontrollen (Positive Referenzsubstanz mit Aktivierung (CP-KO +)), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA+) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Cyclophosphamidkonzentration (M) | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| $5 \times 10^{-6}$               | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 13,28 | 2,9 | 4,8         | 56  | 44  | 0   |
| $5 \times 10^{-6}$               | CA+ 2             | U, weibl.                  | 15                      | 13,93 | 4,2 | 2,9         | 86  | 14  | 0   |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ 1            | L, weibl.                  | 50                      | 10,28 | 3,4 | 9,8         | 24  | 54  | 22  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 9,40  | 3,7 | 7,8         | 6   | 48  | 46  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 13,12 | 3,1 | 6,4         | 19  | 52  | 29  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 16                      | 19,68 | 5,5 | 2,9         | 89  | 11  | 0   |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 9,66  | 2,8 | 7,0         | 9   | 56  | 35  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 12,12 | 3,7 | 6,8         | 36  | 54  | 10  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 50                      | 8,08  | 2,9 | 6,3         | 22  | 38  | 40  |
| $5 \times 10^{-6}$               | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 50                      | 11,62 | 3,9 | 3,3         | 63  | 36  | 1   |

TABELLE 14a:

Positivkontrollen (Positive Referenzsubstanz mit Aktivierung (CP-KO +), SCE-Raten in Versuchen mit metabolischer Aktivierung. Kulturdauer 70 Stunden, Medium HAM's F10 (CA+, CA+ Dy) und 94 Stunden, Medium TC 199 (SCE+, SCE+ Dy)

| Cyclophosphamidkonzentration (M) | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE   | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|------|-------------|-----|-----|-----|
| $1 \times 10^{-5}$               | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 23,76 | 8,2  | 6,5         | 63  | 37  | 0   |
| $1 \times 10^{-5}$               | CA+ 2             | U, weibl.                  | 15                      | 18,80 | 4,6  | 3,6         | 97  | 3   | 0   |
| $1 \times 10^{-5}$               | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 9,68  | 3,8  | 4,1         | 77  | 23  | 0   |
| $1 \times 10^{-5}$ a)            | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | -                       | -     | -    | 7,7         | 75  | 25  | 0   |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 15,60 | 11,6 | 6,7         | 13  | 58  | 29  |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 30,66 | 11,4 | 6,0         | 20  | 68  | 12  |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 17,60 | 6,9  | 8,2         | 36  | 48  | 16  |
| $1 \times 10^{-5}$               | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 50                      | 8,68  | 3,0  | 9,6         | 14  | 48  | 38  |
| $5 \times 10^{-5}$               | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 21,04 | 6,6  | 6,3         | 82  | 18  | 0   |
| $5 \times 10^{-5}$               | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 31,48 | 9,4  | 8,2         | 68  | 32  | 0   |

a) SCE-Rate wurde nicht ermittelt

TABELLE 15:

SCE-Raten nach metabolischer Aktivierung von Cyclophosphamid (CP) in Leukozytenkulturen (SCE+ Dy 6). Medium HAM's F10, Kulturdauer 94 Stunden. Behandlung 46 Stunden nach Kulturan-satz (Behandlungsdauer 24 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung. Vergleich verschiedener Chargen S9-Fraktion in zwei Konzentrationen. Blutspender: D, männlich

| Behandlung und Charge S9-Mix | Cyclophosphamid-konzentration | ausgewer-tete Me-taphasen | SCE-Rate | SE   |
|------------------------------|-------------------------------|---------------------------|----------|------|
| ohne Aktivierung             |                               |                           |          |      |
| O-KO                         |                               | 25                        | 7,5      | 3,6  |
| CP                           | 1,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 7,6      | 4,6  |
| Charge REL 091               |                               |                           |          |      |
| 0,4 mg/ml Protein            |                               |                           |          |      |
| ± 1,3% S9-Fraktion           |                               |                           |          |      |
| CP                           | 5,0 x 10 <sup>-6</sup> M      | 25                        | 11,7     | 4,1  |
| CP                           | 1,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 20,6     | 4,7  |
| CP                           | 5,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 25,9     | 7,0  |
| 0,6 mg/ml Protein            |                               |                           |          |      |
| ± 2% S9-Fraktion             |                               |                           |          |      |
| O-KO                         |                               | 25                        | 6,5      | 2,5  |
| CP                           | 5,0 x 10 <sup>-6</sup> M      | 25                        | 9,2      | 2,8  |
| CP                           | 1,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 13,8     | 4,3  |
| Charge RFI 115               |                               |                           |          |      |
| 0,4 mg/ml Protein            |                               |                           |          |      |
| ± 1,9% S9-Fraktion           |                               |                           |          |      |
| CP                           | 5,0 x 10 <sup>-6</sup> M      | 25                        | 19,0     | 4,0  |
| CP                           | 1,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 39,5     | 8,7  |
| CP                           | 5,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 67,7     | 14,1 |
| 0,6 mg/ml Protein            |                               |                           |          |      |
| ± 2,9% S9-Fraktion           |                               |                           |          |      |
| O-KO                         |                               | 25                        | 6,2      | 2,1  |
| CP                           | 5,0 x 10 <sup>-6</sup> M      | 25                        | 13,7     | 3,8  |
| CP                           | 1,0 x 10 <sup>-5</sup> M      | 25                        | 15,0     | 3,8  |

TABELLE 16:

Vergleich der Aktivierungsfähigkeit von Cyclophosphamid nach unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen bei verschiedenen Chargen S9-Fraktion in den Experimentalserien und variierenden CP-Konzentrationen (Versuche SCE+, SCE+ Dy, CA+ und CA+ Dy). Alle Versuche mit Vorkultivierung von 46 Stunden. (Die Behandlungsschemata sind nach den Kennzeichen der Experimentalserien in Material und Methoden Punkt 2.11.1. zu ersehen. Die Anzahl der ausgewerteten SCE-Raten pro Punkt sind den Tabellen 12a (O-KO), 14, 14a und 15 zu entnehmen)

| Versuchsnummer | Charge und<br>Proteinkon-<br>zentration<br>(mg/ml) | Delta SCE in % zur O-KO+ S9-Mix<br>CP-Konzentration (M) |                    |                    |
|----------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                |                                                    | $5 \times 10^{-6}$                                      | $1 \times 10^{-5}$ | $5 \times 10^{-5}$ |
| CA+ 1          | REL 093 (0,6)                                      | +191%                                                   | +421%              | -                  |
| CA+ 2          | REL 093 (0,6)                                      | +158%                                                   | +248%              | -                  |
| SCE+ 1         | REL 093 (0,6)                                      | + 37%                                                   | -                  | -                  |
| SCE+ 2         | REL 093 (0,6)                                      | + 77%                                                   | +193%              | -                  |
| SCE+ 3         | REL 091 (0,6)                                      | +112%                                                   | -                  | -                  |
| CA+ Dy 1       | RFI 115 (0,4)                                      | -                                                       | +133%              | +405%              |
| CA+ Dy 2       | RFI 115 (0,4)                                      | -                                                       | -                  | +439%              |
| SCE+ Dy 2      | REL 091 (0,6)                                      | + 38%                                                   | +314%              | -                  |
| SCE+ Dy 5      | REL 091 (0,6)                                      | + 76%                                                   | -                  | -                  |
| SCE+ Dy 6      | REL 091 (0,6)                                      | + 42%                                                   | +112%              | -                  |
| SCE+ Dy 6      | REL 091 (0,4)                                      | + 80%                                                   | +217%              | +298%              |
| SCE+ Dy 4      | RFI 032 (0,6)                                      | + 82%                                                   | + 95%              | -                  |
| SCE+ 2 (+Dy)   | REL 093 (0,6)                                      | +119%                                                   | +235%              | -                  |
| SCE+ Dy 6      | RFI 115 (0,6)                                      | +121%                                                   | +142%              | -                  |
| SCE+ Dy 6      | RFI 115 (0,4)                                      | +206%                                                   | +537%              | +992%              |
| SCE+ Dy 3      | RFI 115 (0,4)                                      | + 89%                                                   | +175%              | -                  |
| SCE+ Dy 1      | REL 093 (0,6)                                      | +308%                                                   | -                  | -                  |

TABELLE 16a:

Vergleich der Aktivierungsfähigkeit von Cyclophosphamid durch verschiedene Chargen S9-Fraktion in den Experimentalserien bei variierenden CP-Konzentrationen und unterschiedlichen Aktivierungsbedingungen (Versuche SCE+, SCE+ Dy, CA+ und CA+ Dy). Alle Versuche mit Vorkultivierung von 46 Stunden. (Die Behandlungsschemata sind nach den Kennzeichen der Experimentalserien in Material und Methoden Punkt 2.11.1. zu ersehen. Die Anzahl der ausgewerteten SCE-Raten pro Punkt sind den Tabellen 12a (O-KO), 14, 14a und 15 zu entnehmen)

| Versuchsnummer | Charge und<br>Proteinkon-<br>zentration<br>(mg/ml) | Delta SCE in % zur O-KO+ S9-Mix<br>CP-Konzentration (M) |                    |                    |
|----------------|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|
|                |                                                    | $5 \times 10^{-6}$                                      | $1 \times 10^{-5}$ | $5 \times 10^{-5}$ |
| CA+ 1          | REL 093(0,6)                                       | +191%                                                   | +421%              | -                  |
| CA+ 2          | REL 093(0,6)                                       | +158%                                                   | +248%              | -                  |
| SCE+ 1         | REL 093(0,6)                                       | + 37%                                                   | -                  | -                  |
| SCE+ 2         | REL 093(0,6)                                       | + 77%                                                   | +193%              | -                  |
| SCE+ 2(+Dy)    | REL 093(0,6)                                       | +119%                                                   | +235%              | -                  |
| SCE+ Dy 1      | REL 093(0,6)                                       | +308%                                                   | -                  | -                  |
| SCE+ 3         | REL 091(0,6)                                       | +112%                                                   | -                  | -                  |
| SCE+ Dy 2      | REL 091(0,6)                                       | + 38%                                                   | +314%              | -                  |
| SCE+ Dy 5      | REL 091(0,6)                                       | + 76%                                                   | -                  | -                  |
| SCE+ Dy 6      | REL 091(0,6)                                       | + 42%                                                   | +112%              | -                  |
| SCE+ Dy 6      | REL 091(0,4)                                       | + 80%                                                   | +217%              | +298%              |
| SCE+ Dy 4      | RFC 032(0,6)                                       | + 82%                                                   | + 95%              | -                  |
| CA+ Dy 1       | RFI 115(0,4)                                       | -                                                       | +133%              | +405%              |
| CA+ Dy 2       | RFI 115(0,4)                                       | -                                                       | -                  | +439%              |
| SCE+ Dy 6      | RFI 115(0,6)                                       | +121%                                                   | +142%              | -                  |
| SCE+ Dy 6      | RFI 115(0,4)                                       | +206%                                                   | +537%              | +992%              |
| SCE+ Dy 3      | RFI 115(0,4)                                       | + 89%                                                   | +175%              | -                  |

TABELLE 17:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit MBC ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Referenzen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen | Aberrationen total ohne AL |     |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----|
| DMSO-KO                           | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 0                              | 0                          | 5,2 |
| DMSO-KO                           | CA- 7             | C, männl.                  | 100                     | 1                              | 0                          | 5,1 |
| TREN-KO                           |                   |                            |                         |                                |                            |     |
| $5,0 \times 10^{-8}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 3                              | 2                          | 1,7 |
| $5,0 \times 10^{-8}$              | CA- 7             | C, männl.                  | 100                     | 5                              | 1 Dic                      | 1,8 |
| MBC                               |                   |                            |                         |                                |                            |     |
| $1,0 \times 10^{-8}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 1                              | 0                          | 3,4 |
| $1,0 \times 10^{-7}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 0                              | 1                          | 5,2 |
| $1,0 \times 10^{-6}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 2                              | 0                          | 5,6 |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 0                              | 1                          | 4,5 |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA- 7             | C, männl.                  | 100                     | 3                              | 5                          | 2,7 |
| $4,0 \times 10^{-4}$              | CA- 7             | C, männl.                  | 92                      | 1,1                            | 1,1                        | 3,2 |

1 192 1

TABELLE 18:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit MBC mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei CA+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen | Exch. | Aberrationen total ohne AL | Mitose-index |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------|----------------------------|--------------|
| DMSO-KO                           | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 1 0 0                          | 0     | 0                          | 7,0          |
| DMSO-KO a)                        | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 100                     | 1 1 0                          | 0     | 1                          | 7,4          |
| CP-KO                             |                   |                            |                         |                                |       |                            | 193          |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 4 8 2                          | 1 RB' | 11                         | 6,5          |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 100                     | 8 9 0                          | 0     | 9                          | 8,2          |
| MBC                               |                   |                            |                         |                                |       |                            |              |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 1 2 0                          | 0     | 2                          | 6,4          |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 1 2 0                          | 0     | 2                          | 6,9          |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 100                     | 1 0 1                          | 0     | 1                          | 10,1         |
| $1,0 \times 10^{-4}$ b)           | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 21                      | - - -                          | -     | -                          | 6,7          |

a) 2 Metaphasen mit multiplen Doppelbrüchen nicht berücksichtigt

b) Metaphasen extrem pyknotisch, Auswertung nicht berücksichtigt

TABELLE 19:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), behandelt mit MBC. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 5,08  | 2,3 | 8,6          | 51  | 42  | 7   |
| DMSO-KO                           | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 12,80 | 4,8 | 7,2          | 33  | 55  | 12  |
| DMSO-KO                           | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 5,20  | 2,1 | 5,1          | 73  | 25  | 2   |
| Trenimon-8                        |                   |                            |                         |       |     |              |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>            | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 14,72 | 5,2 | 7,9          | 50  | 48  | 2   |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>            | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 31,60 | 8,3 | 5,4          | 59  | 41  | 0   |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>            | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 22,84 | 6,6 | 3,5          | 72  | 27  | 1   |
| MBC                               |                   |                            |                         |       |     |              |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>            | SCE- 1            | K, weibl.                  | 5                       | -     | -   | 1,3          | 53  | 45  | 2   |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>            | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 6,12  | 3,2 | 7,7          | 54  | 42  | 4   |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 5,20  | 2,3 | 6,8          | 61  | 36  | 3   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup> a)         | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 5,56  | 3,1 | 12,4         | 89  | 10  | 1   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup> a,b)       | SCE- 5            | X, weibl.                  | 0                       | -     | -   | 7,5          | 93  | 7   | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup> a)         | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 12,12 | 4,9 | 9,4          | 94  | 6   | 0   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup> a)         | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 11,16 | 4,2 | 7,9          | 83  | 17  | 0   |
| 7,5 x 10 <sup>-5</sup> a)         | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 10,70 | 3,9 | 6,5          | 84  | 16  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)         | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 12,00 | 4,0 | 7,1          | 89  | 11  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)         | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 5,52  | 3,9 | 6,3          | 94  | 5   | 1   |
| 1,0 x 10 <sup>-3</sup> a,b)       | SCE- 8            | C, männl.                  | 0                       | -     | -   | 6,9          | 96  | 4   | 0   |

- a) Bei  $1 \times 10^{-5}$  M und  $2,5 \times 10^{-5}$  M hohe Rate aneuploider Mitosen (beginnende Polyploidisierung), ab  $5 \times 10^{-5}$  M sind alle 2. Mitosen tetraploid (SCE-Rate auf 2 N bereinigt)
- b) SCE-Raten nicht auswertbar

TABELLE 20:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit MBC. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturanatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden „Pulsbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                 | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 50                                | 5,72  | 3,1 | 10,9             | 19  | 57  | 24  |
| DMSO-KO                                 | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 4,60  | 2,7 | 7,0              | 57  | 41  | 2   |
| DMSO-KO                                 | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,80  | 1,9 | 7,4              | 53  | 47  | 0   |
| Cyclophosphamid                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$                    | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 50                                | 10,28 | 3,4 | 9,8              | 24  | 54  | 22  |
| $5,0 \times 10^{-6}$                    | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 13,28 | 2,9 | 4,8              | 56  | 44  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-5}$                    | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 31,48 | 9,4 | 8,2              | 68  | 32  | 0   |
| MBC                                     |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$                    | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 25                                | 5,12  | 2,6 | 9,9              | 14  | 53  | 33  |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 25                                | 5,28  | 2,5 | 7,9              | 14  | 56  | 30  |
| $1,0 \times 10^{-5}$                    | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 4,48  | 1,9 | 6,4              | 52  | 48  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 5,04  | 2,4 | 6,9              | 54  | 46  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-5}$                    | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,96  | 2,4 | 10,1             | 55  | 45  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,60  | 2,0 | 6,7              | 41  | 59  | 0   |

TABELLE 21:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit MBC. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden "Dauerbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                   | SCE+ Dy 1              | L, weibl.                          | 25                                | 5,80  | 2,2 | 6,8              | 31  | 58  | 11  |
| DMSO-KO                                   | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 5,52  | 2,4 | 7,8              | 22  | 41  | 37  |
| Cyclophosphamid                           |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$                      | SCE+ Dy 1              | L, weibl.                          | 16                                | 19,68 | 5,5 | 2,9              | 89  | 11  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-6}$                      | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 50                                | 8,08  | 2,9 | 6,3              | 22  | 38  | 40  |
| MBC                                       |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$                      | SCE+ Dy 1              | L, weibl.                          | 25                                | 7,04  | 2,9 | 3,4              | 45  | 50  | 5   |
| $1,0 \times 10^{-4}$ a)                   | SCE+ Dy 1              | L, weibl.                          | 25                                | 5,94  | 2,1 | 9,2              | 84  | 16  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-5}$                      | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 5,48  | 2,0 | 5,6              | 22  | 58  | 20  |
| $1,0 \times 10^{-4}$ b)                   | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 4,68  | 2,4 | 6,2              | 23  | 64  | 13  |
| $1,0 \times 10^{-4}$ c)                   | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 5,08  | 1,8 | 6,2              | 23  | 64  | 13  |

a) alle 2. Mitosen tetraploid, SCE-Werte bereinigt auf 2N

b) über die Hälfte der 2. Mitosen tetraploid, nur diploide 2. Mitosen ausgewertet

c) nur tetraploide 2. Mitosen ausgewertet, SCE-Rate auf 2N bereinigt

TABELLE 22:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit DES ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen | Exch. B'' | Aberrationen ohne AL | Aberrationen total index |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------|----------------------|--------------------------|
| ALK-KO                            | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 1                              | 3         | 0                    | 3                        |
| DMSO-KO                           | CA- 6             | L, weibl.                  | 100                     | 1                              | 1         | 0                    | 2                        |
| TREN-KO                           |                   |                            |                         |                                |           |                      |                          |
| $5,0 \times 10^{-8}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 3                              | 14        | 2                    | 16                       |
| $5,0 \times 10^{-8}$              | CA- 6             | L, weibl.                  | 100                     | 7                              | 11        | 5                    | 19                       |
| DES (ALK)                         |                   |                            |                         |                                |           |                      |                          |
| $1,0 \times 10^{-8}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 1                              | 0         | 0                    | 0                        |
| $1,0 \times 10^{-7}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 1                              | 0         | 0                    | 0                        |
| $1,0 \times 10^{-6}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 1                              | 1         | 1                    | 2                        |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA- 1             | D, männl.                  | 100                     | 0                              | 2         | 0                    | 2                        |
| DES                               |                   |                            |                         |                                |           |                      |                          |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA- 6             | L, weibl.                  | 100                     | 2                              | 2         | 2                    | 4                        |
| $1,0 \times 10^{-3}$ a)           | CA- 6             | L, weibl.                  | -                       | -                              | -         | -                    | -                        |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 23:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit DES mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei Ca+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen |    |     | Exch. | Aberrationen total index ohne AL |     |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|----|-----|-------|----------------------------------|-----|
|                                   |                   |                            |                         | AL                             | B' | B'' |       |                                  |     |
| DMSO-KO                           | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 1                              | 0  | 0   | 0     | 0                                | 7,0 |
| DMSO-KO                           | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 2                              | 0  | 0   | 0     | 0                                | 3,7 |
| CP-KO                             |                   |                            |                         |                                |    |     |       |                                  |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8  | 2   | 1 RB' | 11                               | 6,5 |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | Ca+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8  | 0   | 0     | 8                                | 6,3 |
| DES                               |                   |                            |                         |                                |    |     |       |                                  |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 1                              | 2  | 0   | 0     | 2                                | 6,8 |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 0                              | 0  | 0   | 0     | 0                                | 4,2 |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 4                              | 2  | 0   | 0     | 2                                | 4,1 |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 1                              | 0  | 0   | 0     | 0                                | 5,1 |

TABELLE 24:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE -), behandelt mit DES. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen(M)u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|---------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| ALK-KO                          | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 6,00  | 2,4 | 7,8         | 45  | 52  | 3   |
| DMSO-KO                         | SCE- 6            | D, männl.                  | 50                      | 6,60  | 3,0 | 10,6        | 45  | 41  | 14  |
| DMSO-KO                         | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 7,08  | 2,9 | 5,1         | 56  | 40  | 4   |
| Trenimon-8                      |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>          | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 14,72 | 5,2 | 7,9         | 50  | 48  | 2   |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>          | SCE- 6            | D, männl.                  | 42                      | 23,53 | 8,1 | 6,0         | 41  | 46  | 13  |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>          | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 30,48 | 8,4 | 6,7         | 72  | 28  | 0   |
| DES (ALK)-8                     |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>          | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 5,72  | 2,4 | 7,1         | 44  | 53  | 3   |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>          | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 5,92  | 2,7 | 8,8         | 58  | 42  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>          | SCE- 1            | K, weibl.                  | 25                      | 7,08  | 2,3 | 5,8         | 55  | 45  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup> a)       | SCE- 1            | K, weibl.                  | 0                       | -     | -   | 0,4         | 0   | 0   | 0   |
| DES                             |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>          | SCE- 6            | D, männl.                  | 25                      | 7,56  | 3,6 | 9,5         | 28  | 55  | 17  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>          | SCE- 6            | D, männl.                  | 25                      | 7,64  | 2,7 | 8,9         | 26  | 59  | 15  |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>          | SCE- 6            | D, männl.                  | 50                      | 9,16  | 3,9 | 6,6         | 35  | 54  | 11  |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>          | SCE- 6            | D, männl.                  | 50                      | 7,24  | 2,8 | 6,5         | 77  | 22  | 1   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>          | SCE- 6            | D, männl.                  | 0                       | -     | -   | 4,0         | 99  | 1   | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)       | SCE- 8            | L, weibl.                  | 0                       | -     | -   | 5,6         | 100 | 0   | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-3</sup> a)       | SCE- 8            | L, weibl.                  | 0                       | -     | -   | 0,0         | 0   | 0   | 0   |

a) SCE-Rate nicht auswertbar (keine 2. Mitosen)

TABELLE 25:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE -), behandelt mit DES. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung. Vergleich der SCE-Raten nach Behandlung mit DES; Kulturansatz mit dem Blut einer Schwangeren im dritten Trimester (S, weibl.) und Kulturansatz mit dem Blut einer männlichen Person (D, männl.)

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                   | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 5,68  | 2,2 | 3,8              | 43  | 40  | 17  |
| DMSO-KO                                   | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 5,48  | 2,2 | 3,6              | 42  | 48  | 10  |
| Trenimon-8                                |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 26,04 | 9,3 | 2,3              | 52  | 40  | 8   |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 20,64 | 6,7 | 2,4              | 38  | 49  | 13  |
| DES                                       |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 5,69  | 3,5 | 3,0              | 25  | 54  | 21  |
| 2,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 7,88  | 4,6 | 4,6              | 29  | 55  | 16  |
| 4,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 25                                | 5,96  | 3,7 | 4,8              | 63  | 36  | 1   |
| 8,0 x 10 <sup>-5</sup> a)                 | SCE- 9                 | S, weibl.                          | 0                                 | -     | -   | 3,3              | 100 | 0   | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 6,36  | 3,7 | 2,7              | 36  | 54  | 10  |
| 2,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 6,04  | 2,5 | 3,7              | 34  | 50  | 16  |
| 4,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 10                | D, männl.                          | 25                                | 7,40  | 3,2 | 3,8              | 85  | 15  | 0   |
| 8,0 x 10 <sup>-5</sup> a)                 | SCE- 10                | D, männl.                          | 0                                 | -     | -   | 3,1              | 100 | 0   | 0   |

a) SCE-Rate nicht auswertbar (keine 2. Mitosen)

TABELLE 26:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit DES, Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturanatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden "Pulsbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experi-<br>men-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                   | SCE+ 1                      | L, weibl.                          | 50                                | 5,72  | 3,1 | 10,9             | 19  | 57  | 24  |
| DMSO-KO                                   | CA+ 1                       | V, weibl.                          | 25                                | 4,60  | 2,7 | 7,0              | 57  | 41  | 2   |
| DMSO-KO                                   | CA+ Dy 1                    | W, weibl.                          | 15                                | 4,87  | 2,1 | 3,7              | 70  | 30  | 0   |
| Cyclophosphamid                           |                             |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                    | SCE+ 1                      | L, weibl.                          | 25                                | 10,28 | 2,4 | 9,8              | 24  | 54  | 22  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                    | CA+ 1                       | V, weibl.                          | 25                                | 13,28 | 2,9 | 4,8              | 56  | 44  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | CA+ Dy 1                    | W, weibl.                          | 25                                | 9,68  | 3,8 | 4,1              | 77  | 23  | 0   |
| DES                                       |                             |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE+ 1                      | L, weibl.                          | 50                                | 5,42  | 2,5 | 7,3              | 23  | 55  | 22  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | SCE+ 1                      | L, weibl.                          | 25                                | 5,92  | 2,7 | 7,8              | 21  | 58  | 21  |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | CA+ 1                       | V, weibl.                          | 25                                | 5,04  | 2,4 | 6,8              | 47  | 53  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | CA+ 1                       | V, weibl.                          | 25                                | 5,36  | 2,6 | 4,2              | 54  | 45  | 1   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | CA+ Dy 1                    | W, weibl.                          | 16                                | 5,44  | 2,8 | 4,1              | 79  | 21  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | CA+ Dy 1                    | W, weibl.                          | 25                                | 5,48  | 2,3 | 5,1              | 79  | 21  | 0   |

TABELLE 27:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit DES. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden „Dauerbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                      | 5,80  | 2,2 | 6,8          | 31  | 58  | 11  |
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 6,52  | 3,3 | 8,3          | 9   | 59  | 32  |
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 6,40  | 2,6 | 9,4          | 21  | 50  | 29  |
| Cyclophosphamid                   |                   |                            |                         |       |     |              |     |     |     |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 16                      | 19,68 | 5,5 | 2,9          | 89  | 11  | 0   |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 9,66  | 2,8 | 7,0          | 9   | 56  | 35  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 12,12 | 3,7 | 6,8          | 36  | 54  | 10  |
| DES                               |                   |                            |                         |       |     |              |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>            | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 50                      | 9,28  | 3,6 | 6,1          | 38  | 48  | 14  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)         | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 0                       | -     | -   | 5,4          | 100 | 0   | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>            | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 7,80  | 3,4 | 8,6          | 9   | 68  | 23  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> b)         | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                      | 9,42  | 4,9 | 6,6          | 33  | 65  | 2   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> b)         | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                      | 8,44  | 4,8 | 5,2          | 60  | 40  | 0   |

a) SCE-Rate nicht auswertbar (keine 2. Mitosen)

b) vermehrtes Auftreten tetraploider 2. Mitosen!

TABELLE 28:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Estradiol ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | AL | B' | B'' | Exch.    | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|----|----|-----|----------|-------------------------|------------------|
| ALK-KO                                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 200                               | 1  | 4  | 0   | 0        | 4                       | 6,2              |
| DMSO-KO                                 | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 1  | 1  | 0   | 1 RB'    | 2                       | 5,6              |
| TREN-KO                                 |                        |                                    |                                   |    |    |     |          |                         |                  |
| 5,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 2  | 7  | 3   | 1 RB'    | 11                      | 1,8              |
| 5,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 7  | 11 | 5   | 2RB'1Dic | 19                      | 2,5              |
| Estradiol (ALK)                         |                        |                                    |                                   |    |    |     |          |                         |                  |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 0  | 5  | 0   | 0        | 5                       | 3,3              |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 4  | 3  | 1   | 0        | 4                       | 3,1              |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 4  | 3  | 1   | 0        | 4                       | 3,3              |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 2  | 4  | 1   | 0        | 5                       | 1,7              |
| Estradiol                               |                        |                                    |                                   |    |    |     |          |                         |                  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 2  | 1  | 0   | 1 Dic    | 2                       | 2,0              |
| 1,0 x 10 <sup>-3</sup> a)               | CA- 6                  | L, weibl.                          | -                                 | -  | -  | -   | -        | -                       | 0,0              |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 29:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Estradiol mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch (CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei Ca+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen |    |     | Exch. ohne AL | Aberrationen total index |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|----|-----|---------------|--------------------------|
|                                   |                   |                            |                         | AL                             | B' | B'' |               |                          |
| DMSO-KO                           | CA+ 2             | U, weibl.                  | 100                     | 4                              | 1  | 0   | 1 RB'         | 2 3,3                    |
| DMSO-KO a)                        | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 2                              | 0  | 0   | 0             | 3,7                      |
| CP-KO                             |                   |                            |                         |                                |    |     |               |                          |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>            | CA+ 2             | U, weibl.                  | 100                     | 9                              | 9  | 2   | 0             | 11 3,6                   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>            | Ca+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8  | 0   | 0             | 8 6,3                    |
| Estradiol                         |                   |                            |                         |                                |    |     |               |                          |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>            | CA+ 2             | U, weibl.                  | 100                     | 4                              | 3  | 0   | 1 RB'         | 4 4,8                    |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup> a)         | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 3                              | 1  | 0   | 0             | 1 6,1                    |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)         | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 1                              | 1  | 0   | 1 Dic         | 2 7,2                    |

a) je eine Metaphase mit multiplen Brüchen (partielle Fragmentierung), nicht berücksichtigt

TABELLE 30:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), behandelt mit Estradiol. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| ALK-KO                                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 4,96  | 2,1 | 7,3              | 40  | 50  | 10  |
| DMSO-KO                                   | SCE- 8                 | L, weibl.                          | 25                                | 7,08  | 2,9 | 5,1              | 56  | 40  | 4   |
| Trenimon                                  |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-8}$                      | SCE- 1                 | S, weibl.                          | 48                                | 11,83 | 3,6 | 6,0              | 60  | 39  | 1   |
| $2,5 \times 10^{-8}$                      | SCE- 8                 | L, weibl.                          | 25                                | 30,48 | 8,4 | 6,7              | 72  | 28  | 0   |
| Estradiol (ALK)                           |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-8}$                      | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,26  | 2,7 | 5,9              | 37  | 56  | 7   |
| $1,0 \times 10^{-7}$                      | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,64  | 2,5 | 7,1              | 52  | 41  | 7   |
| $1,0 \times 10^{-6}$                      | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,45  | 2,6 | 6,8              | 44  | 52  | 4   |
| $1,0 \times 10^{-5}$                      | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,15  | 2,2 | 3,2              | 42  | 54  | 4   |
| Estradiol                                 |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-4}$ a)                   | SCE- 8                 | L weibl.                           | -                                 | -     | -   | 3,3              | -   | -   | -   |
| $1,0 \times 10^{-3}$ a)                   | SCE- 8                 | L, weibl.                          | -                                 | -     | -   | 0,8              | -   | -   | -   |

a) SCE-Rate nicht auswertbar (keine 2. Mitosen)

TABELLE 31:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Estradiol. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden „Pulsbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,36  | 2,7 | 6,2         | 12  | 29  | 59  |
| DMSO-KO                           | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 5,92  | 2,2 | 3,3         | 91  | 9   | 0   |
| DMSO-KO                           | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 15                      | 4,87  | 2,1 | 3,7         | 70  | 30  | 0   |
| Cyclophosphamid                   |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 9,40  | 3,7 | 7,8         | 6   | 48  | 46  |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 13,93 | 4,2 | 2,9         | 86  | 14  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 9,68  | 3,8 | 4,1         | 77  | 23  | 0   |
| Estradiol                         |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,84  | 2,9 | 6,8         | 7   | 34  | 59  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 5,64  | 2,7 | 8,0         | 7   | 35  | 58  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 5,16  | 1,9 | 4,8         | 90  | 10  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 5,32  | 2,3 | 6,1         | 60  | 40  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 4,12  | 1,7 | 7,2         | 74  | 26  | 0   |

TABELLE 32:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Estradiol. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden "Dauerbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                 | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 6,52  | 3,3 | 8,3              | 9   | 59  | 32  |
| DMSO-KO                                 | SCE+ Dy 3              | R, weibl.                          | 25                                | 6,40  | 2,6 | 9,4              | 21  | 50  | 29  |
| Cyclophosphamid                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$                    | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 9,66  | 2,8 | 7,0              | 9   | 56  | 35  |
| $5,0 \times 10^{-6}$                    | SCE+ Dy 3              | R, weibl.                          | 25                                | 12,12 | 3,7 | 6,8              | 36  | 54  | 10  |
| Estradiol                               |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$                    | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 7,18  | 3,6 | 8,8              | 15  | 42  | 43  |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 8,68  | 2,6 | 5,5              | 26  | 74  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | SCE+ Dy 3              | R, weibl.                          | 25                                | 8,88  | 4,2 | 7,2              | 66  | 34  | 0   |

TABELLE 33:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Estron ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100 Meta-<br>phasen | Exch. | Aberratio- Mitose-<br>nen total index<br>ohne AL |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------|--------------------------------------------------|
| DMSO-KO                                   | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 0     | 0                                                |
| DMSO-KO                                   | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 1     | 2                                                |
| TREN-KO                                   |                        |                                    |                                   |                                     |       |                                                  |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>                    | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 3                                   | 7     | 10                                               |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>                    | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 7                                   | 14    | 22                                               |
| Estron                                    |                        |                                    |                                   |                                     |       |                                                  |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>                    | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 2                                   | 1     | 1                                                |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>                    | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 0     | 1                                                |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 0                                   | 1     | 1                                                |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | CA- 4                  | T, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 1     | 1                                                |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 4                                   | 1     | 1                                                |
| 5,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 2     | 2                                                |

TABELLE 34:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Estron mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch (CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei CA+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen | Exch. | Aberrationen total ohne AL | Mitoseindex |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|-------|----------------------------|-------------|
|                                   |                   |                            |                         | AL                             | B'    | B''                        |             |
| DMSO-KO                           | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 1                              | 0     | 0                          | 0           |
| DMSO-KO a)                        | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 2                              | 0     | 0                          | 7,0         |
| CP-KO                             |                   |                            |                         |                                |       |                            | 3,7         |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8     | 2                          | 1 RB'       |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8     | 0                          | 11          |
|                                   |                   |                            |                         |                                |       |                            | 8           |
| Estron                            |                   |                            |                         |                                |       |                            |             |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 2                              | 0     | 0                          | 0           |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 100                     | 0                              | 1     | 0                          | 0           |
| $5,0 \times 10^{-5}$ a)           | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 1                              | 1     | 0                          | 1           |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 100                     | 2                              | 0     | 1                          | 0           |
|                                   |                   |                            |                         |                                |       |                            | 1           |
|                                   |                   |                            |                         |                                |       |                            | 6,1         |
|                                   |                   |                            |                         |                                |       |                            | 5,9         |
|                                   |                   |                            |                         |                                |       |                            | 5,7         |
|                                   |                   |                            |                         |                                |       |                            | 5,8         |

a) je eine Metaphase mit multiplen Brüchen (partielle Fragmentierung) nicht berücksichtigt

TABELLE 35:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), behandelt mit Estron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 12,80 | 4,8 | 7,2         | 33  | 55  | 12  |
| DMSO-KO                           | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 7,08  | 2,9 | 5,1         | 56  | 40  | 4   |
| Trenimon                          |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $2,5 \times 10^{-8}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 31,60 | 8,3 | 5,4         | 59  | 41  | 0   |
| $2,5 \times 10^{-8}$              | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 30,48 | 8,4 | 6,7         | 72  | 28  | 0   |
| Estron                            |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-9}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 11,28 | 3,7 | 4,9         | 50  | 47  | 3   |
| $1,0 \times 10^{-8}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 10,96 | 5,1 | 3,8         | 43  | 42  | 15  |
| $1,0 \times 10^{-7}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 10,84 | 5,4 | 6,1         | 44  | 47  | 9   |
| $1,0 \times 10^{-6}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 10,44 | 4,3 | 6,2         | 40  | 51  | 9   |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 13,04 | 5,4 | 5,6         | 44  | 46  | 10  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE- 5            | X, weibl.                  | 25                      | 12,08 | 4,6 | 3,8         | 50  | 48  | 2   |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 6,84  | 3,2 | 5,7         | 63  | 33  | 4   |
| $5,0 \times 10^{-4}$              | SCE- 8            | L, weibl.                  | 25                      | 8,04  | 3,7 | 4,9         | 73  | 27  | 0   |

TABELLE 36:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Estron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden "Pulsbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 6,92  | 3,3 | 6,1         | 15  | 55  | 30  |
| DMSO-KO                           | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 4,60  | 2,7 | 7,0         | 57  | 41  | 2   |
| DMSO-KO                           | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 15                      | 4,87  | 2,1 | 3,7         | 70  | 30  | 0   |
| Cyclophosphamid                   |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 13,12 | 3,1 | 6,4         | 19  | 52  | 29  |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 13,28 | 2,9 | 4,8         | 56  | 44  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 9,68  | 3,8 | 4,1         | 77  | 23  | 0   |
| Estron                            |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 6,40  | 2,8 | 6,6         | 18  | 53  | 29  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE+ 3            | Q, weibl.                  | 25                      | 6,24  | 2,8 | 8,1         | 18  | 48  | 34  |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 4,20  | 1,7 | 6,1         | 59  | 41  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ 1             | V, weibl.                  | 25                      | 5,36  | 2,6 | 5,9         | 59  | 41  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 16                      | 5,60  | 2,8 | 5,7         | 75  | 25  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ Dy 1          | W, weibl.                  | 25                      | 4,52  | 2,4 | 5,8         | 82  | 18  | 0   |

TABELLE 37:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Estron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden „Dauerbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                   | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 6,52  | 3,3 | 8,3              | 9   | 59  | 32  |
| DMSO-KO                                   | SCE+ Dy 3              | R, weibl.                          | 25                                | 6,40  | 2,6 | 9,4              | 21  | 50  | 29  |
| Cyclophosphamid                           |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$                      | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 9,66  | 2,8 | 7,0              | 9   | 56  | 35  |
| $5,0 \times 10^{-6}$                      | SCE+ Dy 3              | R, weibl.                          | 25                                | 12,12 | 3,7 | 6,8              | 36  | 54  | 10  |
| Estron                                    |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$                      | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 6,54  | 3,1 | 6,9              | 11  | 49  | 40  |
| $1,0 \times 10^{-4}$                      | SCE+ Dy 2              | R, weibl.                          | 50                                | 7,82  | 3,6 | 10,6             | 17  | 43  | 40  |
| $1,0 \times 10^{-4}$                      | SCE+ Dy 3              | R, weibl.                          | 25                                | 6,32  | 2,4 | 6,9              | 50  | 45  | 5   |

TABELLE 38:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Progesteron ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100 Meta-<br>phasen | Exch.<br>B'' | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------|------------------|
| ALK-KO                                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 200                               | 1                                   | 4            | 0                       | 4                |
| DMSO-KO                                 | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 1            | 0                       | 2                |
| TREN-KO                                 |                        |                                    |                                   |                                     |              |                         |                  |
| 5,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 2                                   | 7            | 3                       | 11               |
| 5,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 6                  | L, weibl.                          | 100                               | 7                                   | 11           | 5                       | 19               |
| Progesteron (ALK)                       |                        |                                    |                                   |                                     |              |                         |                  |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 0                                   | 3            | 0                       | 3                |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 2            | 0                       | 2                |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 1                                   | 3            | 0                       | 3                |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA- 2                  | R, weibl.                          | 100                               | 2                                   | 2            | 2                       | 4                |
| Progesteron                             |                        |                                    |                                   |                                     |              |                         |                  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)               | CA- 6                  | L, weibl.                          | -                                 | -                                   | -            | -                       | -                |
| 5,0 x 10 <sup>-4</sup> a)               | CA- 6                  | L, weibl.                          | -                                 | -                                   | -            | -                       | -                |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 39:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Progesteron mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch(CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei CA+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen(M)u. Kontrollen | Experimentaltalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | Aberrationen in 100 Metaphasen |    |     | Aberrationen total ohne AL |       |
|---------------------------------|----------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|----|-----|----------------------------|-------|
|                                 |                      |                            |                         | AL                             | B' | B'' | Exch.                      | index |
| DMSO-KO                         | CA+ 1                | V, weibl.                  | 100                     | 1                              | 0  | 0   | 0                          | 7,0   |
| DMSO-KO a)                      | CA+ Dy 1             | W, weibl.                  | 100                     | 2                              | 0  | 0   | 0                          | 3,7   |
| CP-KO                           |                      |                            |                         |                                |    |     |                            |       |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>          | CA+ 1                | V, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8  | 2   | 1 RB'                      | 11    |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>          | Ca+ Dy 1             | W, weibl.                  | 100                     | 4                              | 8  | 0   | 0                          | 8     |
| Progesteron                     |                      |                            |                         |                                |    |     |                            |       |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>          | CA+ 1                | V, weibl.                  | 100                     | 3                              | 0  | 0   | 0                          | 6,6   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>          | CA+ 1                | V, weibl.                  | 100                     | 2                              | 2  | 0   | 0                          | 2     |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup> a)       | CA+ Dy 1             | W, weibl.                  | 100                     | 0                              | 0  | 0   | 0                          | 0     |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> b)       | CA+ Dy 1             | W, weibl.                  | -                       | -                              | -  | -   | -                          | -     |

a) je eine Metaphase mit multiplen Brüchen (partielle Fragmentierung) nicht berücksichtigt

b) Metaphasen extrem pyknotisch, es konnten nur 38 Mitosen ausgewertet werden. Die Daten wurden nicht verwendet

TABELLE 40:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), behandelt mit Progesteron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| ALK-KO                                    | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 4,60  | 1,7 | 6,1              | 47  | 47  | 6   |
| DMSO-KO                                   | SCE- 8                 | L, weibl.                          | 25                                | 7,08  | 2,9 | 5,1              | 56  | 40  | 4   |
| Trenimon                                  |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 24,76 | 9,2 | 3,5              | 64  | 36  | 0   |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 8                 | L, weibl.                          | 25                                | 30,48 | 8,4 | 6,7              | 72  | 28  | 0   |
| Progesteron (ALK)                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 4,40  | 1,5 | 4,2              | 54  | 44  | 2   |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>                    | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 4,46  | 1,8 | 4,4              | 65  | 34  | 1   |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>                    | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 15                                | 4,80  | 1,9 | 4,1              | 66  | 34  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 3                 | P, weibl.                          | 25                                | 5,08  | 2,2 | 3,3              | 35  | 60  | 5   |
| Progesteron                               |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)                 | SCE- 8                 | L, weibl.                          | -                                 | -     | -   | 0,0              | -   | -   | -   |
| 5,0 x 10 <sup>-4</sup> a)                 | SCE- 8                 | L, weibl.                          | -                                 | -     | -   | 0,0              | -   | -   | -   |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 41:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Progesteron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden "Pulsbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                 | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 50                                | 5,72  | 3,1 | 10,9             | 19  | 57  | 24  |
| DMSO-KO                                 | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 4,60  | 2,7 | 7,0              | 57  | 41  | 2   |
| DMSO-KO                                 | CA+ Dy 1               | W, weibl.                          | 15                                | 4,87  | 2,1 | 3,7              | 70  | 30  | 0   |
| Cyclophosphamid                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 25                                | 10,28 | 2,4 | 9,8              | 24  | 54  | 22  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 13,28 | 2,9 | 4,8              | 56  | 44  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ Dy 1               | W, weibl.                          | 25                                | 9,68  | 3,8 | 4,1              | 77  | 23  | 0   |
| Progesteron                             |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 25                                | 8,04  | 4,7 | 7,8              | 22  | 57  | 21  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | SCE+ 1                 | L, weibl.                          | 25                                | 6,76  | 3,3 | 5,6              | 17  | 59  | 24  |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 4,16  | 2,0 | 6,6              | 66  | 34  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA+ 1                  | V, weibl.                          | 25                                | 4,40  | 2,0 | 4,9              | 60  | 39  | 1   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ Dy 1               | W, weibl.                          | 25                                | 5,80  | 2,5 | 8,0              | 66  | 34  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA+ Dy 1               | W, weibl.                          | 13                                | 5,00  | 2,5 | 5,0              | 64  | 36  | 0   |

TABELLE 42:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Progesteron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden "Dauerbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Me-taphasen | SCE   | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|--------------------------|-------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                       | 5,80  | 2,2 | 6,8          | 31  | 58  | 11  |
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                       | 6,52  | 3,3 | 8,3          | 9   | 59  | 32  |
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                       | 6,40  | 2,6 | 9,4          | 21  | 50  | 29  |
| Cyclophosphamid                   |                   |                            |                          |       |     |              |     |     |     |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 16                       | 19,68 | 5,5 | 2,9          | 89  | 11  | 0   |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                       | 9,66  | 2,8 | 7,0          | 9   | 56  | 35  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>            | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                       | 12,12 | 3,7 | 6,8          | 36  | 54  | 10  |
| Progesteron                       |                   |                            |                          |       |     |              |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>            | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 25                       | 10,76 | 4,2 | 6,1          | 55  | 39  | 6   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)         | SCE+ Dy 1         | L, weibl.                  | 0                        | -     | -   | 2,5          | 89  | 11  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>            | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                       | 7,60  | 3,5 | 6,1          | 11  | 51  | 38  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>            | SCE+ Dy 2         | R, weibl.                  | 50                       | 6,36  | 2,7 | 8,0          | 28  | 67  | 5   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>            | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                       | 8,56  | 3,7 | 5,9          | 51  | 47  | 2   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>            | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                       | 8,40  | 3,1 | 8,7          | 40  | 53  | 7   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>            | SCE+ Dy 3         | R, weibl.                  | 25                       | 10,96 | 3,7 | 6,1          | 59  | 41  | 0   |

a) 2. Mitosen nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 43:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Testosteron ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Experimenten-<br>talserie               | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100 Me-<br>taphasen | B' | B'' | Exch. | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index |
|-----------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----|-----|-------|-------------------------|------------------|
| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen |                                    |                                   | AL                                  | B' | B'' | Exch. | ohne AL                 |                  |
| DMSO-KO                                 | CA- 3                              | E, männl.                         | 2                                   | 2  | 2   | 0     | 4                       | 7,3              |
| DMSO-KO                                 | CA- 7                              | C, männl.                         | 1                                   | 2  | 1   | 0     | 3                       | 5,1              |
| TREN-KO                                 |                                    |                                   |                                     |    |     |       |                         |                  |
| 5,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 3                              | E, männl.                         | 8                                   | 9  | 5   | 1 RB' | 15                      | 4,3              |
| 5,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 7                              | C, männl.                         | 5                                   | 11 | 2   | 1 Dic | 14                      | 1,8              |
| Testosteron                             |                                    |                                   |                                     |    |     |       |                         |                  |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                  | CA- 3                              | E, männl.                         | 1                                   | 0  | 0   | 0     | 0                       | 10,8             |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>                  | CA- 3                              | E, männl.                         | 1                                   | 1  | 0   | 0     | 1                       | 6,7              |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | CA- 3                              | E, männl.                         | 1                                   | 2  | 0   | 0     | 2                       | 8,9              |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA- 3                              | E, männl.                         | 1                                   | 2  | 3   | 0     | 5                       | 8,4              |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA- 7                              | C, männl.                         | 2                                   | 4  | 1   | 0     | 5                       | 0,9              |
| 1,0 x 10 <sup>-3</sup> a)               | CA- 7                              | C, männl.                         | -                                   | -  | -   | -     | -                       | 0,0              |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 44:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Testosteron mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch(CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei Ca+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100<br>Metaphasen | Exch. | Aberratio- Mitose-<br>nen total index<br>ohne AL |       |    |      |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------|--------------------------------------------------|-------|----|------|
|                                         |                        |                                    | AL                                | B'                                | B''   |                                                  |       |    |      |
| DMSO-KO                                 | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 100                               | 4                                 | 1     | 0                                                | 1 RB' | 2  | 3,3  |
| DMSO-KO a)                              | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 1                                 | 1     | 0                                                | 0     | 1  | 7,4  |
| CP-KO                                   |                        |                                    |                                   |                                   |       |                                                  |       |    |      |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 100                               | 9                                 | 9     | 2                                                | 0     | 11 | 3,6  |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | Ca+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 8                                 | 9     | 0                                                | 0     | 9  | 8,2  |
| Testosteron                             |                        |                                    |                                   |                                   |       |                                                  |       |    |      |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 100                               | 2                                 | 4     | 0                                                | 0     | 4  | 6,0  |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 0                                 | 0     | 0                                                | 0     | 0  | 7,3  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup> a)               | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 1                                 | 0     | 0                                                | 0     | 0  | 10,7 |

a) Je eine Metaphase mit multiplen Brüchen (partielle Fragmentierung) nicht berücksichtigt

TABELLE 45:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), behandelt mit Testosteron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| ALK-KO                                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 4,96  | 2,1 | 7,3              | 40  | 50  | 10  |
| DMSO-KO                                   | SCE- 7                 | C, männl.                          | 25                                | 5,20  | 2,1 | 5,1              | 73  | 25  | 2   |
| Trenimon                                  |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 48                                | 11,83 | 3,6 | 6,0              | 60  | 39  | 1   |
| 2,5 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 7                 | C, männl.                          | 25                                | 22,84 | 6,6 | 3,5              | 72  | 27  | 1   |
| Testosteron (ALK)                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-8</sup>                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,46  | 2,4 | 6,5              | 44  | 50  | 6   |
| 1,0 x 10 <sup>-7</sup>                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,08  | 1,9 | 5,6              | 59  | 36  | 5   |
| 1,0 x 10 <sup>-6</sup>                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,30  | 2,3 | 6,7              | 58  | 39  | 3   |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                    | SCE- 2                 | S, weibl.                          | 50                                | 5,46  | 2,3 | 4,0              | 47  | 48  | 5   |
| Testosteron                               |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                    | SCE- 7                 | C, männl.                          | 25                                | 4,96  | 2,1 | 3,6              | 69  | 31  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-3</sup> a)                 | SCE- 7                 | C, männl.                          | -                                 | -     | -   | 0,0              | -   | -   | -   |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 46:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Testosteron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden „Pulsbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,36  | 2,7 | 6,2         | 12  | 29  | 59  |
| DMSO-KO                           | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 5,92  | 2,2 | 3,3         | 91  | 9   | 0   |
| DMSO-KO                           | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 4,80  | 1,9 | 7,4         | 53  | 47  | 0   |
| Cyclophosphamid                   |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 9,40  | 3,7 | 7,8         | 6   | 48  | 46  |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | CA+ 2             | U, weibl.                  | 15                      | 13,93 | 4,2 | 2,9         | 86  | 14  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 31,48 | 9,4 | 8,2         | 68  | 32  | 0   |
| Testosteron                       |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 6,00  | 3,3 | 5,9         | 15  | 42  | 43  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE+ 2            | B, männl.                  | 25                      | 5,32  | 2,3 | 8,0         | 11  | 52  | 37  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ 2             | U, weibl.                  | 25                      | 6,72  | 3,7 | 6,0         | 86  | 14  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-5}$              | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 5,36  | 2,8 | 7,3         | 66  | 34  | 0   |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | CA+ Dy 2          | A, männl.                  | 25                      | 4,52  | 2,6 | 10,7        | 57  | 43  | 0   |

TABELLE 47:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Testosteron. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden „Dauerbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                 | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 5,52  | 2,4 | 7,8              | 22  | 41  | 37  |
| DMSO-KO                                 | SCE+ Dy 5              | D, männl.                          | 25                                | 5,88  | 2,7 | 3,2              | 50  | 39  | 11  |
| Cyclophosphamid                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 50                                | 8,08  | 2,9 | 6,3              | 22  | 38  | 40  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | SCE+ Dy 5              | D, männl.                          | 50                                | 11,62 | 3,9 | 3,3              | 63  | 36  | 1   |
| Testosteron                             |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 5,16  | 1,8 | 5,9              | 16  | 44  | 40  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | SCE+ Dy 4              | H, männl.                          | 25                                | 5,60  | 2,4 | 9,8              | 11  | 42  | 47  |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | SCE+ Dy 5              | D, männl.                          | 25                                | 6,16  | 2,8 | 5,0              | 54  | 36  | 10  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | SCE+ Dy 5              | D, männl.                          | 25                                | 5,28  | 2,5 | 2,8              | 48  | 45  | 7   |

TABELLE 48:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Androstanolon ohne metabolische Aktivierung. (Experimentalserien CA-) Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden, Substanzbehandlung 24 Stunden. Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen (M) u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100 Meta-<br>phasen | B' | B'' | Exch. | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index |
|-------------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|----|-----|-------|-------------------------|------------------|
| DMSO-KO                                   | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 2                                   | 0  | 1   | 0     | 1                       | 3,0              |
| DMSO-KO                                   | CA- 7                  | C, männl.                          | 100                               | 1                                   | 2  | 1   | 0     | 3                       | 5,1              |
| TREN-KO                                   |                        |                                    |                                   |                                     |    |     |       |                         |                  |
| $2,5 \times 10^{-8}$                      | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 5                                   | 11 | 2   | 0     | 13                      | 1,7              |
| $2,5 \times 10^{-8}$                      | CA- 7                  | C, männl.                          | 100                               | 7                                   | 18 | 6   | 0     | 24                      | 3,8              |
| Androstanolon                             |                        |                                    |                                   |                                     |    |     |       |                         |                  |
| $1,0 \times 10^{-7}$                      | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 2                                   | 1  | 0   | 0     | 1                       | 5,4              |
| $1,0 \times 10^{-6}$                      | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 0                                   | 0  | 0   | 0     | 0                       | 3,9              |
| $1,0 \times 10^{-5}$                      | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 0                                   | 0  | 2   | 0     | 2                       | 2,4              |
| $1,0 \times 10^{-4}$                      | CA- 5                  | G, männl.                          | 100                               | 3                                   | 2  | 0   | 0     | 2                       | 0,5              |
| $5,0 \times 10^{-4}$ a)                   | CA- 7                  | C, männl.                          | -                                 | -                                   | -  | -   | -     | -                       | 0,0              |
| $1,0 \times 10^{-3}$ a)                   | CA- 7                  | C, männl.                          | -                                 | -                                   | -  | -   | -     | -                       | 0,0              |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 49:

Strukturelle Chromosomenaberrationen in Leukozytenkulturen nach Behandlung mit Androstanolon mit metabolischer Aktivierung. Direkte Zugabe des S9-Mix (CA+) und indirekte Zugabe des S9-Mix im Dialyseschlauch(CA+ Dy). Dauer der Substanzbehandlung bei Ca+: 1 Stunde, bei CA+ Dy: 3 Stunden. Medium HAM's F10, Kulturdauer 46 plus 24 Stunden, Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | Aberrationen in 100<br>Metaphasen | AL | B' | B''      | Exch. | Aberratio-<br>nen total | Mitose-<br>index |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----|----|----------|-------|-------------------------|------------------|
| DMSO-KO                                 | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 100                               | 4                                 | 1  | 0  | 0        | 1 RB' | 2                       | 3,3              |
| DMSO-KO                                 | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 1                                 | 1  | 0  | 0        | 0     | 1                       | 7,4              |
| CP-KO                                   |                        |                                    |                                   |                                   |    |    |          |       |                         |                  |
| $1,0 \times 10^{-5}$                    | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 100                               | 9                                 | 9  | 2  | 0        | 0     | 11                      | 3,6              |
| $5,0 \times 10^{-5}$                    | Ca+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 8                                 | 9  | 0  | 0        | 0     | 9                       | 8,2              |
| Androstanolon                           |                        |                                    |                                   |                                   |    |    |          |       |                         |                  |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 100                               | 4                                 | 2  | 2  | 1 RB'B'' |       | 5                       | 5,6              |
| $5,0 \times 10^{-5}$                    | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 0                                 | 1  | 0  | 0        | 0     | 1                       | 8,7              |
| $1,0 \times 10^{-4}$                    | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 100                               | 1                                 | 0  | 0  | 0        | 0,    | 0                       | 5,3              |

TABELLE 50:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen ohne metabolische Aktivierung (SCE-), behandelt mit Androstanolon. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 72 Stunden, Behandlung 24 Stunden nach Kulturansatz bis zur Aufarbeitung (Dauer der Substanzbehandlung 48 Stunden). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitose-index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|--------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 6,20  | 4,8 | 2,7          | 57  | 28  | 15  |
| DMSO-KO                           | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 5,20  | 2,1 | 5,1          | 73  | 25  | 2   |
| Trenimon                          |                   |                            |                         |       |     |              |     |     |     |
| $2,5 \times 10^{-8}$              | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 26,32 | 7,9 | 2,5          | 50  | 45  | 5   |
| $2,5 \times 10^{-8}$              | SCE- 7            | C, männl.                  | 25                      | 22,84 | 6,6 | 3,5          | 72  | 27  | 1   |
| Androstanolon                     |                   |                            |                         |       |     |              |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-8}$              | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 6,04  | 2,6 | 4,0          | 47  | 41  | 12  |
| $1,0 \times 10^{-7}$              | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 5,84  | 2,4 | 3,1          | 39  | 43  | 18  |
| $1,0 \times 10^{-6}$              | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 5,32  | 1,9 | 3,3          | 40  | 46  | 14  |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE- 4            | I, männl.                  | 25                      | 6,88  | 3,6 | 6,8          | 39  | 34  | 27  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE- 4            | I, männl.                  | 9                       | 5,11  | 2,3 | 1,6          | 84  | 16  | 0   |
| $5,0 \times 10^{-4}$ a)           | SCE- 7            | C, männl.                  | -                       | -     | -   | 0,0          | -   | -   | -   |
| $1,0 \times 10^{-3}$ a)           | SCE- 7            | C, männl.                  | -                       | -     | -   | 0,1          | -   | -   | -   |

a) nicht auswertbar (zytotoxisch)

TABELLE 51:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Androstanolon. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+) oder Medium HAM's F10, Kulturdauer 70 Stunden (CA+ und CA+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturanatz (Behandlungsdauer 1 bis 6 Stunden "Pulsbehandlung"). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentra-<br>tionen(M)u.<br>Kontrollen | Experimen-<br>talserie | Blutspen-<br>der und<br>Geschlecht | ausgewer-<br>tete Me-<br>taphasen | SCE   | SE  | Mitose-<br>index | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------------|------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|-------|-----|------------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                                 | SCE+ 2                 | B, männl.                          | 25                                | 6,36  | 2,7 | 6,2              | 12  | 29  | 59  |
| DMSO-KO                                 | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 25                                | 5,92  | 2,2 | 3,3              | 91  | 9   | 0   |
| DMSO-KO                                 | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,80  | 1,9 | 7,4              | 53  | 47  | 0   |
| Cyclophosphamid                         |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | SCE+ 2                 | B, männl.                          | 25                                | 9,40  | 3,7 | 7,8              | 6   | 48  | 46  |
| 5,0 x 10 <sup>-6</sup>                  | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 15                                | 13,93 | 4,2 | 2,9              | 86  | 14  | 0   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 31,48 | 9,4 | 8,2              | 68  | 32  | 0   |
| Androstanolon                           |                        |                                    |                                   |       |     |                  |     |     |     |
| 1,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | SCE+ 2                 | B, männl.                          | 25                                | 6,72  | 2,8 | 7,9              | 12  | 32  | 56  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | SCE+ 2                 | B, männl.                          | 25                                | 6,92  | 3,7 | 9,4              | 10  | 33  | 57  |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA+ 2                  | U, weibl.                          | 25                                | 6,40  | 2,4 | 5,6              | 85  | 15  | 0   |
| 5,0 x 10 <sup>-5</sup>                  | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,72  | 1,9 | 8,7              | 55  | 45  | 0   |
| 1,0 x 10 <sup>-4</sup>                  | CA+ Dy 2               | A, männl.                          | 25                                | 4,56  | 2,2 | 5,3              | 46  | 54  | 0   |

TABELLE 52:

Schwesterchromatidenaustausche in Leukozytenkulturen mit metabolischer Aktivierung, Behandlung mit Androstanolon. Kulturmedium TC 199, Kulturdauer 94 Stunden (SCE+ Dy). Behandlung 46 Stunden nach Kulturansatz (Behandlungsdauer 24 bis 48 Stunden „Dauerbehandlung“). Colcemid 4 Stunden vor Aufarbeitung

| Konzentrationen (M) u. Kontrollen | Experimentalserie | Blutspender und Geschlecht | ausgewertete Metaphasen | SCE   | SE  | Mitoseindex | M 1 | M 2 | M 3 |
|-----------------------------------|-------------------|----------------------------|-------------------------|-------|-----|-------------|-----|-----|-----|
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 5,52  | 2,4 | 7,8         | 22  | 41  | 37  |
| DMSO-KO                           | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 25                      | 5,88  | 2,7 | 3,2         | 50  | 39  | 11  |
| Cyclophosphamid                   |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 50                      | 8,08  | 2,9 | 6,3         | 22  | 38  | 40  |
| $5,0 \times 10^{-6}$              | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 50                      | 11,62 | 3,9 | 3,3         | 63  | 36  | 1   |
| Androstanolon                     |                   |                            |                         |       |     |             |     |     |     |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 5,28  | 2,4 | 8,8         | 12  | 57  | 31  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE+ Dy 4         | H, männl.                  | 25                      | 4,92  | 2,3 | 8,1         | 15  | 47  | 38  |
| $1,0 \times 10^{-5}$              | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 25                      | 5,64  | 2,5 | 3,5         | 58  | 31  | 11  |
| $1,0 \times 10^{-4}$              | SCE+ Dy 5         | D, männl.                  | 25                      | 6,20  | 3,4 | 4,7         | 56  | 41  | 3   |

TABELLE 53:

Mitoseindices (in % ausgezählte transformierte Kerne (n)) in 2 Tage-Lymphozytenkulturen mit HAM's F10, behandelt mit verschiedenen Konzentrationen MBC (MI 1) vier Stunden vor Aufarbeitung. Keine Colcemidzugabe (Colcemid als Positivkontrolle), Blutspender O, weibl.

| Substanzen u.<br>Konzentra-<br>tionen (M) | Parallel-<br>kultur A |                      | Parallel-<br>kultur B |                      | Summe aus<br>A und B |                       |
|-------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                                           | n                     | Mito-<br>se<br>index | n                     | Mito-<br>se<br>index | n                    | Mito-<br>se-<br>index |
| O-KO                                      | 2000                  | 1,3                  | 2000                  | 1,8                  | 4000                 | 1,6                   |
| COLC-CO<br>$2 \times 10^{-7}$             | 2000                  | 6,5                  | 2000                  | 6,1                  | 4000                 | 6,3                   |
| MBC                                       |                       |                      |                       |                      |                      |                       |
| $5 \times 10^{-7}$                        | 2000                  | 1,4                  | 2000                  | 1,5                  | 4000                 | 1,5                   |
| $1 \times 10^{-6}$                        | 2000                  | 0,8                  | 2000                  | 0,9                  | 4000                 | 0,9                   |
| $5 \times 10^{-6}$                        | 2000                  | 2,2                  | 2000                  | 3,4                  | 4000                 | 2,8                   |
| $1 \times 10^{-5}$                        | 2000                  | 4,3                  | 2000                  | 5,6                  | 4000                 | 5,0                   |
| $5 \times 10^{-5}$                        | 2000                  | 3,7                  | 2000                  | 5,3                  | 4000                 | 4,5                   |
| $1 \times 10^{-4}$                        | 2000                  | 3,9                  | 2000                  | 4,7                  | 4000                 | 4,3                   |
| $5 \times 10^{-4}$                        | 2000                  | 5,0                  | 2000                  | 4,8                  | 4000                 | 4,9                   |

TABELLE 53a:

Mitoseindices (in % ausgezählte transformierte Kerne (n))  
 in 2 Tage-Lymphozytenkulturen mit HAM's F10, behandelt mit  
 allen Testsubstanzen in einer Konzentration von  $1 \times 10^{-4}$  M  
 (MI 2) vier Stunden vor Aufarbeitung. Keine Colcemidzugabe  
 (Colcemid als Positivkontrolle), Blutspender M, weibl.

| Substanzen u.<br>Konzentra-<br>tionen (M) | Parallel-<br>kultur A |                      | Parallel-<br>kultur B |                      | Summe aus<br>A und B |                       |
|-------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                                           | n                     | Mito-<br>se<br>index | n                     | Mito-<br>se<br>index | n                    | Mito-<br>se-<br>index |
| O-KO                                      | 1000                  | 0,8                  | 1000                  | 0,5                  | 2000                 | 0,7                   |
| DMSO-KO                                   | 1000                  | 0,6                  | 1000                  | 0,5                  | 2000                 | 0,6                   |
| COLC-CO                                   |                       |                      |                       |                      |                      |                       |
| $2 \times 10^{-8}$                        | 1000                  | 1,1                  | 1000                  | 0,7                  | 2000                 | 0,9                   |
| $5 \times 10^{-8}$                        | 1000                  | 1,2                  | 1000                  | 1,8                  | 2000                 | 1,5                   |
| $1 \times 10^{-7}$                        | 1000                  | 1,6                  | 1000                  | 1,5                  | 2000                 | 1,6                   |
| $2 \times 10^{-7}$                        | 1000                  | 3,4                  | 1000                  | 3,1                  | 2000                 | 3,3                   |
| MBC                                       | 1000                  | 2,8                  | 1000                  | 2,3                  | 2000                 | 2,6                   |
| DES                                       | 1000                  | 2,5                  | 1000                  | 2,6                  | 2000                 | 2,6                   |
| Estradiol                                 | 1000                  | 2,1                  | 1000                  | 2,1                  | 2000                 | 2,1                   |
| Estron                                    | 1000                  | 0,8                  | 1000                  | 0,9                  | 2000                 | 0,9                   |
| Progesteron                               | 1000                  | 0,8                  | 1000                  | 0,6                  | 2000                 | 0,7                   |
| Testosteron                               | 1000                  | 0,7                  | 1000                  | 0,6                  | 2000                 | 0,7                   |
| Androstanolon                             | 1000                  | 0,8                  | 1000                  | 1,0                  | 2000                 | 0,9                   |

TABELLE 54:

Mikrokerne (MK) in Interphasen von Lymphozyten, behandelt mit MBC, DES oder Estradiol 40 Stunden nach Kulturbeginn bis zur Aufarbeitung (MI 3). Medium HAM's F10, Kulturdauer 68 Stunden, keine Colcemidzugabe, Aufarbeitung mit isotoner Kochsalzlösung statt hypotonem Schock. Blutspender Q, weibl. (ausgewertete Zellen pro Punkt und Konzentration: 1.Auswertung je 1000 Zellen, 2.Auswertung je 500 Zellen; Auswertungskriterien siehe 3.2.2. Seite 83)

| Substanzen u.<br>Konzentra-<br>tionen (M) | Mito-<br>se-<br>index | 1. Auswertung   |                | 2. Auswertung   |                |
|-------------------------------------------|-----------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
|                                           |                       | Mikro-<br>kerne | Zellen<br>m.MK | Mikro-<br>kerne | Zellen<br>m.MK |
| O-KO                                      | 1,9                   | 3               | 3              | 0               | 0              |
| DMSO-KO                                   | 3,6                   | 4               | 4              | 4               | 4              |
| COLC-CO                                   |                       |                 |                |                 |                |
| 1 x 10 <sup>-8</sup>                      | 3,4                   | 9               | 9              | -               | -              |
| 2 x 10 <sup>-8</sup>                      | 3,5                   | 7               | 7              | 8               | 8              |
| MBC                                       |                       |                 |                |                 |                |
| 5 x 10 <sup>-7</sup>                      | 1,8                   | -               | -              | 2               | 2              |
| 1 x 10 <sup>-6</sup>                      | 1,9                   | -               | -              | 18              | 16             |
| 5 x 10 <sup>-6</sup>                      | 9,7                   | 8               | 8              | 20              | 20             |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 14,1                  | 34              | 26             | 50              | 46             |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 15,6                  | 182             | 117            | 230             | 124            |
| DES                                       |                       |                 |                |                 |                |
| 5 x 10 <sup>-6</sup>                      | 2,7                   | -               | -              | 12              | 12             |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 3,7                   | 11              | 11             | 14              | 14             |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 18,5                  | 41              | 32             | 118             | 88             |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 13,4                  | 41              | 29             | 62              | 38             |
| Estradiol                                 |                       |                 |                |                 |                |
| 5 x 10 <sup>-6</sup>                      | 2,5                   | -               | -              | 8               | 8              |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 1,9                   | 5               | 5              | 12              | 12             |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 9,8                   | 24              | 22             | 26              | 18             |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 15,5                  | 59              | 38             | 116             | 82             |

TABELLE 54a:

Nekrotische Zellkerne in Präparaten von Lymphozytenkulturen, behandelt mit MBC, DES und Estradiol 40 Stunden nach Kulturbeginn bis zur Aufarbeitung (MI 3) nach 68 Stunden, Medium HAM's F10. Blutspender Q, weibl.

(ausgewertet wurden 2 Bahnen im ersten Drittel eines jeden Präparats vom Mattschliff aus bei 250-facher Vergrößerung)

| Substanzen und<br>Konzentrationen | nekrotische<br>Kerne | Substanzen und<br>Konzentrationen | nekrotische<br>Kerne |
|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|
| O-KO                              | 3                    | DES                               |                      |
| DMSO-KO                           | 5                    | $5 \times 10^{-6}$ M              | 4                    |
|                                   |                      | $1 \times 10^{-5}$ M              | 17                   |
| COLC-KO                           |                      | $5 \times 10^{-5}$ M              | 22                   |
| $2 \times 10^{-8}$ M              | 9                    | $1 \times 10^{-4}$ M              | 44                   |
| MBC                               |                      | Estradiol                         |                      |
| $5 \times 10^{-7}$ M              | 1                    | $5 \times 10^{-6}$ M              | 2                    |
| $1 \times 10^{-6}$ M              | 4                    | $1 \times 10^{-5}$ M              | 14                   |
| $5 \times 10^{-6}$ M              | 3                    | $5 \times 10^{-5}$ M              | 9                    |
| $1 \times 10^{-5}$ M              | 5                    | $1 \times 10^{-4}$ M              | 53                   |
| $5 \times 10^{-5}$ M              | 7                    |                                   |                      |

TABELLE 55:

Nachweis von C-Banden in Metaphasechromosomen und von Chromozentren in Interphasekernen. Versuch MI 4: Leukozytenkulturen mit HAM's F10, Behandlung nach 40 Stunden, Aufarbeitung nach 70 Stunden, mit hypotonem Schock und C-Bandenfärbung modifiziert nach SUMNER (1972). Versuch MI 6: Leukozytenkulturen mit HAM's F10, Behandlung nach 40 Stunden, Aufarbeitung nach 72 Stunden mit hypotonem Schock, Giemsa-Normalfärbung. Blutspender N, weibl. (MI 4) und R, weibl. (MI 6) (n: Anzahl der ausgewerteten Metaphasen oder Interphasen)

| Substanzen u. Konzentrationen (M) | n  | C-Banden in Metaphasechromosomen |     | n  | Chromozentren in Interphasekernen |     |           |     |
|-----------------------------------|----|----------------------------------|-----|----|-----------------------------------|-----|-----------|-----|
|                                   |    | MI 4:                            |     |    | MI 4:                             |     | MI 6:     |     |
|                                   |    | $\bar{x}$                        | SE  |    | $\bar{x}$                         | SE  | $\bar{x}$ | SE  |
| O-KO                              | 2  | 18,5                             | 7,8 | 10 | 15,4                              | 4,4 | 21,4      | 8,1 |
| DMSO-KO                           | -  | -                                | -   | 10 | -                                 | -   | 21,4      | 7,3 |
| TREN-KO                           |    |                                  |     |    |                                   |     |           |     |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>              | 2  | 16,5                             | 9,2 | -  | -                                 | -   | -         | -   |
| COLC-KO                           |    |                                  |     |    |                                   |     |           |     |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>              | -  | -                                | -   | 10 | 17,8                              | 7,2 | -         | -   |
| MBC                               |    |                                  |     |    |                                   |     |           |     |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 6  | 16,5                             | 4,6 | 10 | 15,3                              | 4,2 | 18,0      | 6,2 |
| DES                               |    |                                  |     |    |                                   |     |           |     |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 10 | 24,8                             | 5,8 | -  | -                                 | -   | -         | -   |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 10 | 21,8                             | 4,9 | 10 | 19,2                              | 5,5 | 17,6      | 5,0 |
| Estradiol                         |    |                                  |     |    |                                   |     |           |     |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 10 | 26,1                             | 5,8 | -  | -                                 | -   | -         | -   |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 10 | 26,3                             | 7,7 | 10 | 19,5                              | 5,0 | 19,2      | 4,8 |
| Summe                             | 50 | 23,2                             | 6,7 | 50 | 17,4                              | 5,5 | 19,5      | 6,3 |

TABELLE 56:

Nachweis von Chromozentren in Mikrokernen. Versuch MI 4 und MI 5. Leukozytenkulturen mit HAM's F10, keine Colcemidzugabe; Behandlung nach 40 Stunden, Aufarbeitung nach 70 Stunden (MI 4) und nach 90 Stunden (MI 5). Aufarbeitung mit hypotonem Schock und C-Bandenfärbung modifiziert nach SUMNER (1972), Blutspender N, weibl.

(n: Anzahl der ausgewerteten Mikrokerne)

| Substanzen u.<br>Konzentra-<br>tionen (M) | Versuch MI 4 |                                        | Versuch MI 5 |                                        | Summe MI 4/5 |                                        |
|-------------------------------------------|--------------|----------------------------------------|--------------|----------------------------------------|--------------|----------------------------------------|
|                                           | n            | MK mit<br>Chromo-<br>zentren<br>(in %) | n            | MK mit<br>Chromo-<br>zentren<br>(in %) | n            | MK mit<br>Chromo-<br>zentren<br>(in %) |
| O-KO                                      | 0            | -                                      | 2            | 0                                      | 2            | 0                                      |
| DMSO-KO                                   | 4            | 0                                      | 2            | 0                                      | 6            | 0                                      |
| Σ Kontrollen                              | 4            | 0                                      | 4            | 0                                      | 8            | 0                                      |
| TREN-KO <sub>7</sub>                      |              |                                        |              |                                        |              |                                        |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>                      | 6            | 0                                      | 16           | 12,5                                   | 22           | 9,1                                    |
| 5 x 10 <sup>-7</sup>                      | 12           | 0                                      | 10           | 0                                      | 22           | 0                                      |
| Σ Trenimon                                | 18           | 0                                      | 26           | 7,7                                    | 44           | 4,5                                    |
| COLC-KO <sub>7</sub>                      |              |                                        |              |                                        |              |                                        |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>                      | 34           | 82,4                                   | 0            | -                                      | 34           | 82,4                                   |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>                      | 66           | 72,7                                   | 48           | 62,5                                   | 114          | 68,4                                   |
| Σ Colcemid                                | 100          | 76,0                                   | 48           | 62,5                                   | 148          | 71,6                                   |
| MBC                                       |              |                                        |              |                                        |              |                                        |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 20           | 50,0                                   | 26           | 61,5                                   | 46           | 56,5                                   |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 76           | 48,7                                   | 72           | 63,9                                   | 148          | 56,1                                   |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 36           | 50,0                                   | 30           | 53,3                                   | 66           | 51,5                                   |
| Σ MBC                                     | 132          | 49,2                                   | 128          | 60,9                                   | 260          | 55,0                                   |
| DES                                       |              |                                        |              |                                        |              |                                        |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 2            | 0                                      | 0            | -                                      | 2            | 0                                      |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 14           | 42,9                                   | 24           | 58,3                                   | 38           | 52,6                                   |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 18           | 66,7                                   | 0            | -                                      | 18           | 66,7                                   |
| Σ DES                                     | 34           | 52,9                                   | 24           | 58,3                                   | 58           | 55,2                                   |
| Estradiol                                 |              |                                        |              |                                        |              |                                        |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 8            | 50,0                                   | 0            | -                                      | 8            | 50,0                                   |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 12           | 66,7                                   | 2            | 0                                      | 14           | 57,1                                   |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 16           | 75,0                                   | 14           | 57,1                                   | 30           | 66,7                                   |
| Σ Estradiol                               | 36           | 66,7                                   | 16           | 50,0                                   | 52           | 61,5                                   |

TABELLE 57:

Nachweis von Polyploidien in 1., 2. und 3. Mitosen nach Zugabe von BuDR. Leukozytenkulturen mit HAM's F10, BuDR-Zugabe bei Kulturbeginn, Behandlung nach 40 Stunden. Aufarbeitung nach 70 Stunden (MI 4) mit hypotonem Schock. Keine Colcemid-zugabe. Differentielle Schwesterchromatidenanfärbung. Blutspender N, weibl.

(n: Anzahl der ausgewerteten Mitosen)

| Substanzen u. Konzentrationen (M) | n   | Mitose-index | 1.Mitosen 2 N (%) | 4 N (%) | 2.Mitosen 2 N (%) | 4 N (%) | 3.Mitosen 2 N (%) | 4 N (%) |
|-----------------------------------|-----|--------------|-------------------|---------|-------------------|---------|-------------------|---------|
| O-KO                              | 100 | 2,2          | 21,0              | 0       | 50,0              | 1       | 28,0              | 0       |
| DMSO-KO                           | 100 | 2,3          | 37,0              | 0       | 45,0              | 0       | 18,0              | 0       |
| TREN-KO                           |     |              |                   |         |                   |         |                   |         |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>              | 100 | 1,4          | 36,0              | 0       | 61,0              | 0       | 3,0               | 0       |
| 5 x 10 <sup>-7</sup>              | 50  | 0,4          | 70,0              | 0       | 30,0              | 0       | 0                 | 0       |
| COLC-CO                           |     |              |                   |         |                   |         |                   |         |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>              | 300 | 11,0         | 94,0              | 0       | 5,0               | 0       | 0                 | 0,3     |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>              | 300 | 16,4         | 90,0              | 0       | 9,0               | 0,3     | 0                 | 0,7     |
| MBC                               |     |              |                   |         |                   |         |                   |         |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 10,0         | 81,0              | 0       | 16,0              | 0,7     | 2,3               | 0       |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 9,9          | 71,3              | 0       | 5,0               | 21,3    | 0,3               | 2       |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 300 | 11,7         | 85,3              | 0       | 2,0               | 11,6    | 0                 | 1       |
| DES                               |     |              |                   |         |                   |         |                   |         |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 100 | 2,3          | 34,0              | 0       | 54,0              | 0       | 12,0              | 0       |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 6,2          | 84,3              | 0       | 14,7              | 0       | 0,7               | 0,3     |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 300 | 9,0          | 91,0              | 0       | 8,7               | 0,3     | 0                 | 0       |
| Estradiol                         |     |              |                   |         |                   |         |                   |         |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 100 | 2,7          | 44,0              | 0       | 44,0              | 0       | 12,0              | 0       |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 8,5          | 62,7              | 0       | 34,0              | 0,3     | 3,0               | 0       |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 300 | 12,6         | 80,0              | 0       | 20,0              | 0       | 0                 | 0       |

TABELLE 57a:

Nachweis von Polyploidien in 1., 2. und 3. Mitosen nach Zugabe von BUdR. Leukozytenkulturen mit HAM's Fl0, BUdR-Zugabe bei Kulturbeginn, Behandlung nach 40 Stunden, Aufarbeitung nach 90 Stunden (MI 5) mit hypotonem Schock. Keine Colcemidzugabe. Differentielle Schwesterchromatidenanfärbung. Blutspender N, weibl.

(n: Anzahl der ausgewerteten Mitosen)

| Substanzen u. Konzentrationen (M) | n   | Mito-<br>se-<br>index | 1.Mitosen |     | 2.Mitosen |      | 3.Mitosen |     |
|-----------------------------------|-----|-----------------------|-----------|-----|-----------|------|-----------|-----|
|                                   |     |                       | 2 N       | 4 N | 2 N       | 4 N  | 2 N       | 4 N |
|                                   |     |                       | (%)       | (%) | (%)       | (%)  | (%)       | (%) |
| O-KO                              | 100 | 2,5                   | 12,0      | 0   | 23,0      | 0    | 65,0      | 0   |
| DMSO-KO                           | 100 | 2,5                   | 3,0       | 0   | 37,0      | 0    | 60,0      | 0   |
| TREN-KO                           |     |                       |           |     |           |      |           |     |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>              | 100 | 1,9                   | 12,0      | 0   | 58,0      | 0    | 30,0      | 0   |
| 5 x 10 <sup>-7</sup>              | 100 | 0,7                   | 30,0      | 0   | 70,0      | 0    | 0         | 0   |
| COLC-CO                           |     |                       |           |     |           |      |           |     |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>              | 300 | 7,7                   | 25,7      | 0   | 35,7      | 0    | 38,7      | 0   |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>              | 300 | 12,6                  | 94,0      | 0   | 1,7       | 3,3  | 0,3       | 0,7 |
| MBC                               |     |                       |           |     |           |      |           |     |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 9,8                   | 49,0      | 0   | 45,0      | 2,3  | 3,7       | 0   |
| 5 x 10 <sup>-5</sup> a)           | 300 | 9,3                   | 54,3      | 0   | 4,3       | 39,0 | 0,3       | 1,3 |
| 1 x 10 <sup>-4</sup> a)           | 300 | 7,4                   | 70,1      | 0   | 0         | 28,9 | 0         | 0,3 |
| DES                               |     |                       |           |     |           |      |           |     |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 100 | 2,3                   | 17,0      | 0   | 34,0      | 0    | 49,0      | 0   |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 6,7                   | 83,9      | 0   | 10,7      | 4,7  | 0,7       | 0   |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 300 | 5,8                   | 94,3      | 0   | 3,7       | 1,7  | 0         | 0,3 |
| Estradiol                         |     |                       |           |     |           |      |           |     |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 100 | 1,4                   | 13,0      | 0   | 35,0      | 0    | 51,0      | 1,0 |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 300 | 9,5                   | 35,0      | 0   | 57,7      | 1,7  | 5,3       | 0,3 |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 300 | 4,8                   | 80,0      | 0   | 14,7      | 3,3  | 2,0       | 0   |

a) je 2 oktoploide 3. Mitosen in 300 Metaphasen ( $\hat{=}$  0,7%)

TABELLE 58:

Relativer Anteil polyploider (tetraploider und oktoploider)  
2. und 3. Mitosen in den Versuchen MI 4 und MI 5 (Versuchs-  
bedingungen siehe Tabellen 57 und 57a)

(n: Anteil diploider und polyploider 2. und 3. Mitosen (%)  
an der Gesamtmitoserate)

| Substanzen u.<br>Konzentra-<br>tionen (M) | n    | MI 4 (70 Std.):<br>Anteil (%) an Po-<br>lyploidien in 2.<br>und 3. Mitosen | n    | MI 5 (90 Std.):<br>Anteil (%) an Po-<br>lyploidien in 2.<br>und 3. Mitosen |
|-------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------------------|
| O-KO                                      | 79,0 | 1,3                                                                        | 88,0 | 0                                                                          |
| DMSO-KO                                   | 63,0 | 0                                                                          | 97,0 | 0                                                                          |
| TREN-KO                                   |      |                                                                            |      |                                                                            |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>                      | 64,0 | 0                                                                          | 88,0 | 0                                                                          |
| 5 x 10 <sup>-7</sup>                      | 30,0 | 0                                                                          | 70,0 | 0                                                                          |
| COLC-KO                                   |      |                                                                            |      |                                                                            |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>                      | 5,3  | 5,7                                                                        | 74,3 | 0                                                                          |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>                      | 10,0 | 10,0                                                                       | 6,0  | 66,7                                                                       |
| MBC                                       |      |                                                                            |      |                                                                            |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 19,0 | 3,7                                                                        | 51,0 | 4,5                                                                        |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 28,7 | 81,2                                                                       | 45,0 | 89,6                                                                       |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 14,7 | 86,4                                                                       | 29,2 | 100,0                                                                      |
| DES                                       |      |                                                                            |      |                                                                            |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 66,0 | 0                                                                          | 83,0 | 0                                                                          |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 15,7 | 1,9                                                                        | 16,0 | 29,4                                                                       |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 9,0  | 3,3                                                                        | 5,7  | 35,1                                                                       |
| Estradiol                                 |      |                                                                            |      |                                                                            |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                      | 5,0  | 0                                                                          | 87,0 | 0                                                                          |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                      | 37,3 | 0,8                                                                        | 65,0 | 3,1                                                                        |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                      | 20,0 | 0                                                                          | 20,0 | 16,5                                                                       |

TABELLE 59:

Bestimmung des Ploidiegrades in Lymphozytenkulturen (HAM's F10), behandelt mit MBC, DES und Estradiol 40 Stunden nach Kulturbeginn bis zur Aufarbeitung. Kulturdauer 72 Stunden (MI 6), 84 Stunden (MI 7), 96 Stunden (MI 8) und 112 Stunden (MI 9). Blutspender R, weibl. (Anzahl ausgewerteter Mitosen in O-KO und DMSO-KO je 100, in allen übrigen Präparaten je 200)

| Substanzen u. Konzentrationen (M) | Versuch MI 6<br>(72 Std.) |      |     |  | Versuch MI 7<br>(84 Std.) |      |     |  | Versuch MI 8<br>(96 Std.) |      |     |  | Versuch MI 9<br>(112 Std.) |      |     |  |
|-----------------------------------|---------------------------|------|-----|--|---------------------------|------|-----|--|---------------------------|------|-----|--|----------------------------|------|-----|--|
|                                   | Ploidiegrad(%)            |      |     |  | Ploidiegrad(%)            |      |     |  | Ploidiegrad(%)            |      |     |  | Ploidiegrad(%)             |      |     |  |
|                                   | 2 N                       | 4 N  | 8 N |  | 2 N                       | 4 N  | 8 N |  | 2 N                       | 4 N  | 8 N |  | 2 N                        | 4 N  | 8 N |  |
| O-KO                              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 99,0                      | 1,0  | 0   |  | 97,0                       | 3,0  | 0   |  |
| DMSO-KO                           | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 99,0                       | 1,0  | 0   |  |
| COLC-CO                           |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                            |      |     |  |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 99,5                      | 0,5  | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 97,0                       | 3,0  | 0   |  |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 93,0                      | 7,0  | 0   |  | 90,5                      | 9,5  | 0   |  | 75,0                       | 23,0 | 2,0 |  |
| MBC                               |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                            |      |     |  |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 99,5                      | 0,5  | 0   |  | 95,0                      | 5,0  | 0   |  | 90,5                       | 9,5  | 0   |  |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 86,5                      | 13,5 | 0   |  | 67,5                      | 30,5 | 2,0 |  | 54,0                      | 39,0 | 7,0 |  | 56,5                       | 37,5 | 6,0 |  |
| DES                               |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                            |      |     |  |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 99,0                      | 1,0  | 0   |  | 96,5                      | 3,5  | 0   |  | 90,0                       | 10,0 | 0   |  |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 97,5                      | 2,5  | 0   |  | 88,0                       | 12,0 | 0   |  |
| Estradiol                         |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                           |      |     |  |                            |      |     |  |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 98,5                       | 1,5  | 0   |  |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>              | 100,0                     | 0    | 0   |  | 100,0                     | 0    | 0   |  | 92,5                      | 7,5  | 0   |  | 92,5                       | 7,5  | 0   |  |

TABELLE 60:

Bestimmung der Mitoseindices in Lymphozytenkulturen (HAM's F10), behandelt mit MBC, DES und Estradiol 40 Stunden nach Kulturbeginn bis zur Aufarbeitung. Kulturdauer 72 Stunden (MI 6), 84 Stunden (MI 7), 96 Stunden (MI 8) und 112 Stunden (MI 9). Blutspender R, weibl.

(1000 ausgewertete Zellen je Präparat)

| Substanzen und<br>Konzentrationen (M) | Mitoseindices (%) in Versuch: |      |      |      |
|---------------------------------------|-------------------------------|------|------|------|
|                                       | MI 6                          | MI 7 | MI 8 | MI 9 |
| O-KO                                  | 1,6                           | 1,7  | 2,4  | 1,9  |
| DMSO-KO                               | 2,6                           | 1,8  | 2,1  | 1,3  |
| COLC-KO                               |                               |      |      |      |
| 1 x 10 <sup>-7</sup>                  | 7,4                           | 9,2  | 7,4  | 6,6  |
| 2 x 10 <sup>-7</sup>                  | 15,3                          | 10,5 | 8,9  | 9,0  |
| MBC                                   |                               |      |      |      |
| 1 x 10 <sup>-5</sup>                  | 5,8                           | 6,8  | 6,3  | 7,1  |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                  | 7,5                           | 7,2  | 6,0  | 4,0  |
| DES                                   |                               |      |      |      |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                  | 6,3                           | 6,8  | 7,0  | 5,0  |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                  | 12,1                          | 9,6  | 7,7  | 4,7  |
| Estradiol                             |                               |      |      |      |
| 5 x 10 <sup>-5</sup>                  | 2,7                           | 5,9  | 5,3  | 3,9  |
| 1 x 10 <sup>-4</sup>                  | 7,1                           | 6,5  | 7,5  | 7,8  |

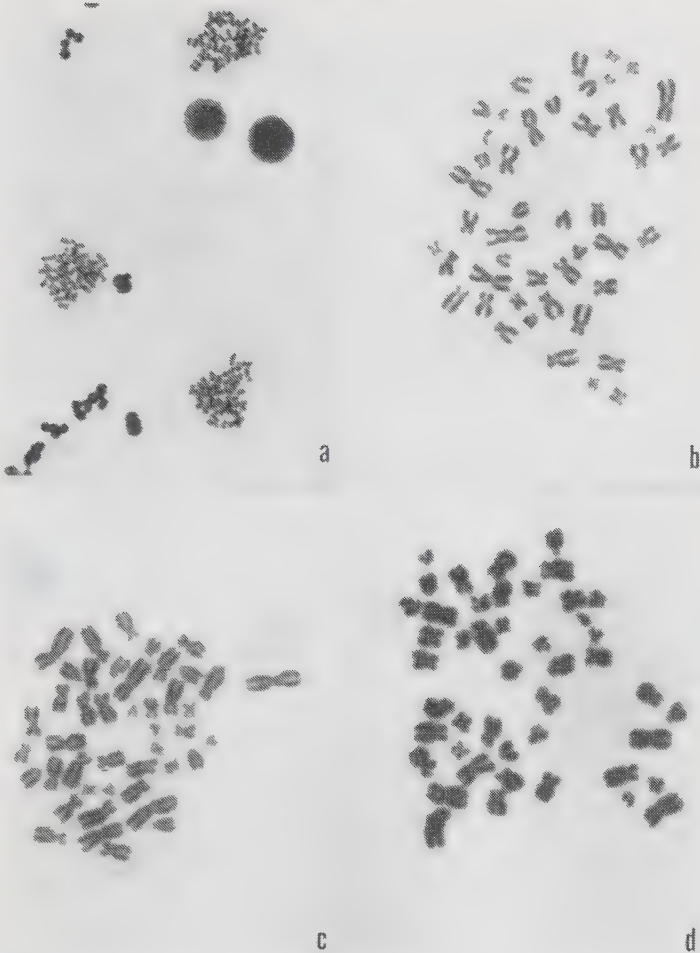


Abbildung 1:

Arretierte Metaphasen nach Behandlung mit MBC (a, b), DES (c) und Estradiol (d) in Lymphozytenkulturen 4 Stunden vor Aufarbeitung (Medium HAM's F10, Kulturdauer 48 Stunden), keine Colcemidzugabe. Versuch MI 2, Konzentration  $1 \times 10^{-4}$  M

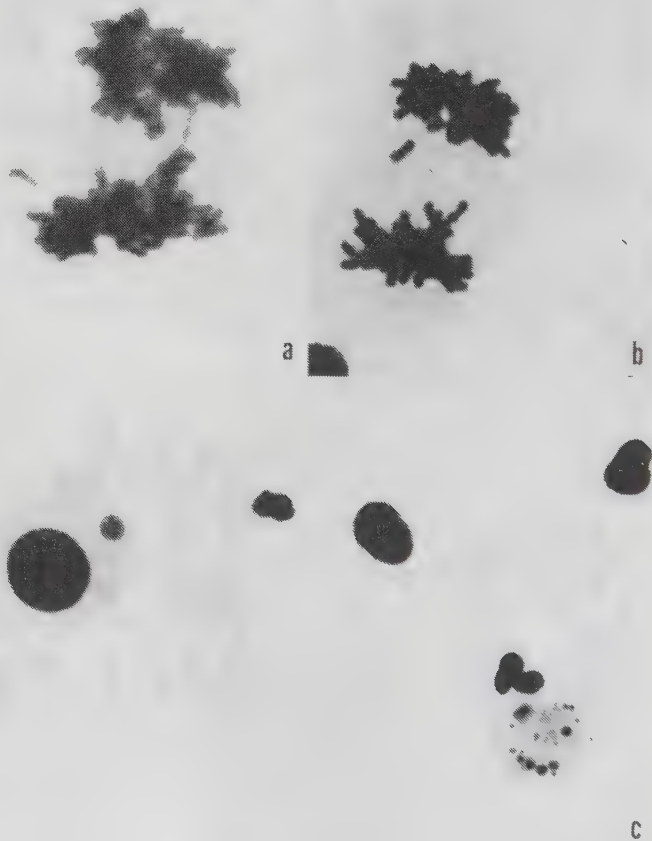


Abbildung 2:

Aberrante Anaphasen (a, b), Mikrokern und nekrotischer Zellkern (c) in Lymphozytenkulturen zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen. a) Versuch MI 3: Anaphasebrücke nach Behandlung mit DES Behandlung nach 40 Stunden, Aufarbeitung nach 68 Stunden ; b) „lagging chromatin“ nach Behandlung mit Estradiol  $5 \times 10^{-5}$  M, sonst wie a; c) Versuch MI 6: Mikrokern und nekrotischer Zellkern nach Behandlung mit MBC  $5 \times 10^{-5}$  M (KCl-Aufarbeitung, keine C-Bandenfärbung)

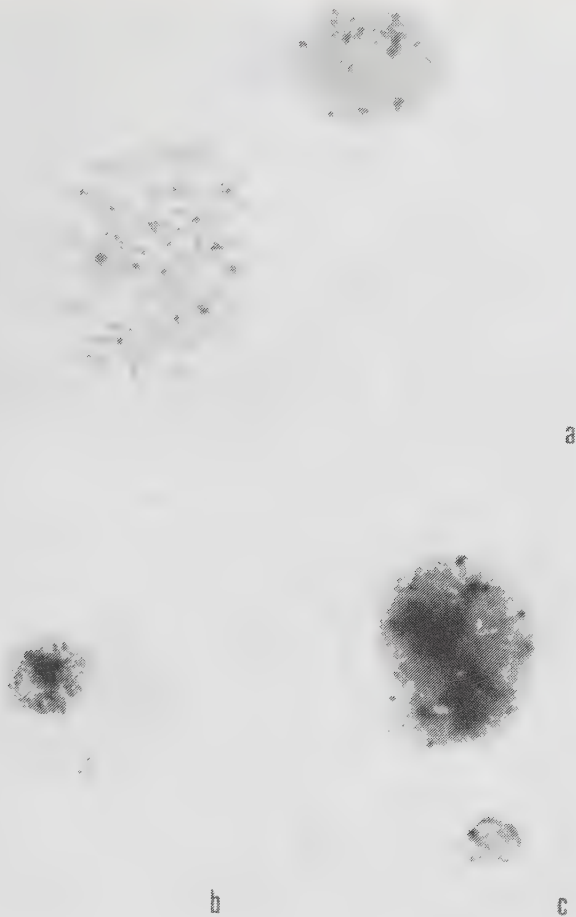


Abbildung 3:

Zentromerisches Heterochromatin in Metaphasechromosomen (a), Interphasekernen (a, c) und Mikrokernen (b, c). a) Versuch MI 5: Metaphasechromosomen mit C-Banden und Interphasekern mit Chromozentren nach Behandlung mit Estradiol  $5 \times 10^{-5}$  M und C-Bandenfärbung. b) Versuch MI 3: Mikrokern mit deutlich erkennbaren Chromozentren (keine C-Bandenfärbung, NaCl-Aufarbeitung) Estradiol  $1 \times 10^{-4}$  M. c) Versuch MI 5: Polyploider Hauptkern und Mikrokern mit Chromozentren, Estradiol  $1 \times 10^{-4}$  M, C-Bandenfärbung

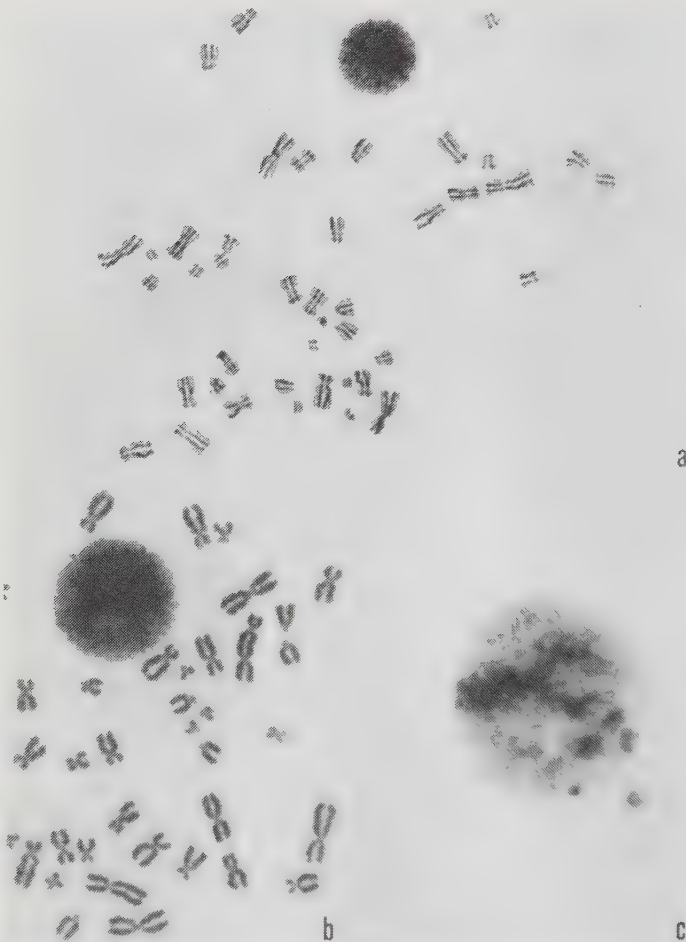


Abbildung 4:

Endoreduplikation (a), Diczentrisches Chromosom (Dic) mit Fragment (b) und Mikrokern (c). a) Versuch MI 4: Endoreduplikation, Colcemid  $1 \times 10^{-7}$  M, kein Substanzeffekt, Endoreduplikationen sind nach längerer Kultivierung gehäuft in allen Präparaten zu finden; b) Versuch CA- 6: Dic, Estradiol ohne S9-Mix  $1 \times 10^{-4}$  M; c) Versuch MI 4: Mikrokern, Trenimon  $1 \times 10^{-7}$  M, C-Bandenfärbung, Chromozentren im Hauptkern sichtbar, keine Chromozentren im Mikrokern

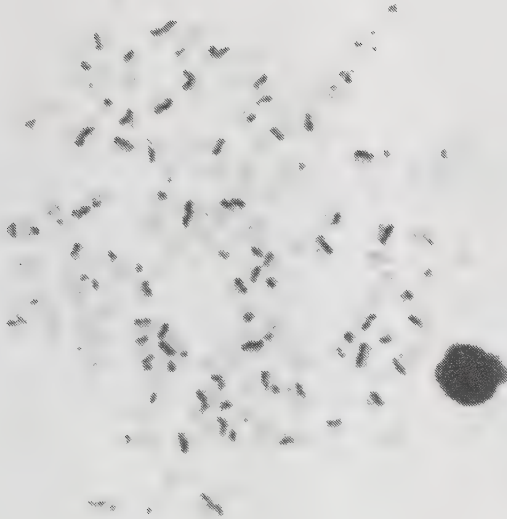


Abbildung 5:

Polyploide Metaphase (hypooktoploid, (165 Chromosomen) mit differentieller Anfärbung der Schwesterchromatiden (SCE-Färbung). Versuch MI 5: MBC  $1 \times 10^{-4}$  M, 3. Mitose nach BUdR-Zugabe



### Danksagung

Herrn Prof. Dr. Günter Obe danke ich für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung, die es ermöglichte, diese Arbeit durchzuführen.

Darüberhinaus habe ich allen Mitarbeitern der Fa. Schering A.G., Berlin, vor allem den Mitarbeitern des Hauptdepartments Experimentelle Toxikologie zu danken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit anzufertigen. Mein Dank gilt der Fa. Schering A.G. für die finanzielle Unterstützung und Herrn Dr. R. Lang und Herrn Dr. P. Günzel für ihre freundlichen Hinweise.

Herrn Dr. S. Madle (Bundesgesundheitsamt Berlin) und Herrn Prof. Dr. B. Beek (Umweltbundesamt Berlin) danke ich besonders für ihre großzügige Bereitschaft zu Diskussionen und hilfreichen Gesprächen.

Diese Arbeit wurde in den Laboratorien des Hauptdepartments Experimentelle Toxikologie der Fa. Schering A.G. Berlin angefertigt.



LEBENS LAUF

8. 6. 1950 in Hildesheim, Niedersachsen, geboren
- 1956 Eintritt in die Volksschule
- 1960 Wechsel zur Mittelschule
- März 1966 Realschulabschluß
- April 1966 Beginn einer Lehre zum Rundfunk- und  
Fernsehtechnik- Mechaniker
- September 1969 Abschluß der Lehre mit der Gesellenprüfung
- Oktober 1969 Eintritt in die Bundeswehr
- September 1971 Beendigung des Wehrdienstes
- September 1971 Eintritt in das Hessenkolleg Wiesbaden zur  
Erlangung der allgemeinen Hochschulreife auf  
dem 2. Bildungsweg
- Dezember 1973 Abitur
- April 1974 Immatrikulation an der Freien Universität  
Berlin, Fachbereich Biologie
- Januar 1977 Vordiplomprüfung in Biologie abgelegt
- Januar 1981 Diplomprüfung in Biologie abgelegt mit dem  
Hauptfach Allgemeine Biologie und Genetik
- Februar 1981 Beginn der Doktorarbeit unter der Leitung  
von Prof. Obe vom Institut für Allgemeine  
Genetik der F.U. Berlin, durchgeführt in den  
Laboratorien der Fa. Schering A.G., unter-  
stützt mit einem Promotionsstipendium der  
Firma.





